



SPE monstervoorbewerking van Thiopental en zijn metaboliet Pentobarbital

Hai Holthuysen, Niels Suntjens
Laboratorium Apotheek Viecuri
Medisch Centrum voor Noord-Limburg
Tegelseweg 210, 5912 BL Venlo
hholthuysen@viecuri.nl

Inleiding

Thiopental wordt (o.a.) gebruikt om patiënten in coma te brengen. Dit kan nodig zijn bij patiënten die een hoge intracraniale druk hebben door een hersentrauma. Thiopental zorgt hierbij voor het stil leggen van de hersenactiviteit, zodat de hersenen kunnen herstellen. Bovendien verlaagt thiopental de intracraniale druk (Nadeel: ook orgaanfuncties worden door de thiopental onderdrukt). Thiopental wordt voor 3-5% gemetaboliseerd tot pentobarbital, dat een vergelijkbare werking heeft.

Halfwaardetijd thiopental:

10-12 (obese patiënten 28) uur

Halfwaardetijd pentobarbital:

35-50 uur

Om de juiste diepte van coma te houden is spiegelbepaling noodzakelijk.

Om een EEG goed te kunnen beoordelen is het noodzakelijk dat beide spiegels erg laag zijn.

Materialen en methode

Monster voorbereiding

De monstervoorbewerking wordt uitgevoerd met een extractie Manifold (Waters, Etten-leur, part. No. WAT200606).

De SPE kolommetjes die worden gebruikt zijn Waters oasis HLB 1cc (30mg) extractie cartridges (Waters, Etten-Leur, part. No. WAT94225).

HPLC

Het HPLC systeem bestaat uit een Alliance 2695 Separation Module met een 996 Photo Diode Array detector. De analytische kolom is een Symmetry C8 (150 x 3,9 mm

i.d.), 5mm (Waters, Etten-Leur, part no. WAT 46970) in combinatie met een voorkolom Symmetry C8 Sentry Guard (20 x 3,9 mm i.d.), 5mm (Waters, Etten-Leur, part. No. WAT054250).

De loopvloeistof bestaat uit een mengsel van een 0,1 M KH₂PO₄ buffer op pH 4 gebracht met fosforzuur 17% en acetonitril in een verhouding 70-30. De flow bedraagt 1,3 ml/min. De detectie van thiopental vindt plaats bij 294 nm. De detectie van pentobarbital vindt plaats bij 215 nm. Het injectievolume is 50 µl.

Grondstoffen en reagentia

Kaliumdiwaterstoffsfaat (Bufa B.V.)

Lichrosolv® Acetonitril

(Merck nederland)

Methanol p.a. (Merck Nederland)

Fosforzuur 85% (Merck Nederland)

Aqua destilata (Baxter)

Nesdonal® (Rhône-Poulenc)

Pentobarbital (1,0 mg/ml in methanol)

Secobarbital (1,0 mg/ml in methanol)

Clozapine (1,0 mg/ml in methanol)

Standaarden

Thiopental

Los op een flacon Nesdonal® in 20,0 ml aqua demi (oplossing A). Verdun oplossing A 25 maal met methanol (oplossing B).

Standaard 1 (9,16 mg/l):

100 µl oplossing B ad 10,0 ml blanco plasma.

Standaard 2 (18,32 mg/l):

200 µl oplossing B ad 10,0 ml blanco plasma.

Standaard 3 (36,64 mg/l):

400 µl oplossing B ad 10,0 ml blanco plasma

Pentobarbital

Uitgaande van een pentobarbital oplossing van 1,0 mg/ml in methanol (oplossing C)

Standaard 1 (2,0 mg/l):

20 µl oplossing C ad 10,0 ml blanco plasma

Standaard 2 (5,0 mg/l):

50 µl oplossing C ad 10,0 ml blanco plasma

Standaard 3 (10,0 mg/l):

100 µl oplossing C ad 10,0 ml blanco plasma

De standaarden 1, 2 en 3 van zowel thiopental als pentobarbital kunnen in een maatkolf worden samen-gevoegd.

Interne standaard

Clozapine (1,0 mg/ml in methanol)

voor de bepaling van thiopental.

Secobarbital (1,0 mg/ml in methanol) voor de bepaling van pentobarbital.

Uitvoering van de extractie

Voeg aan 1,2 ml plasma van standaarden en monsters 20 µl fosforzuur 85% toe (verstoring geneesmiddel-eiwit interactie) en 20 µl van de interne standaarden clozapine en secobarbital.

Plaats de HLB extractie kolommetjes op de extractie manifold.

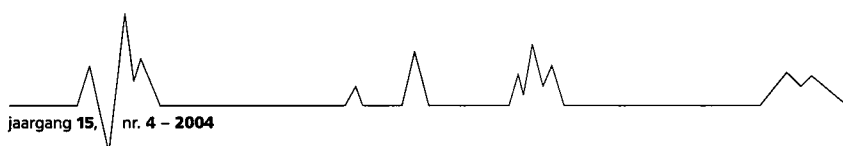
Voer aansluitend de volgende stappen puntsgewijs uit.

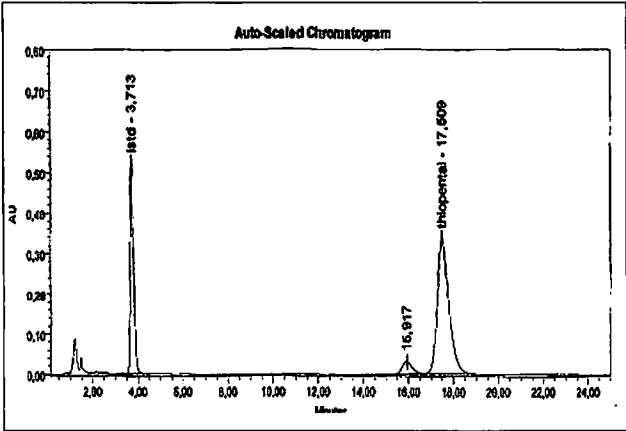
Breng achtereenvolgens op de extractie kolommetjes

1. 1 ml methanol (conditionering)
2. 1 ml water (conditionering)
3. 0,4 ml plasma van standaard of monster
4. 1 ml 2% azijnzuur (wasstap)
5. Plaats het aantal benodigde buisjes voor de elutie in de manifold.
6. 1 ml methanol (elutie)
7. Damp de methanol droog onder een stroom van stikstof.
8. Neem het residu op in 150 µl loopmiddel en injecteer.

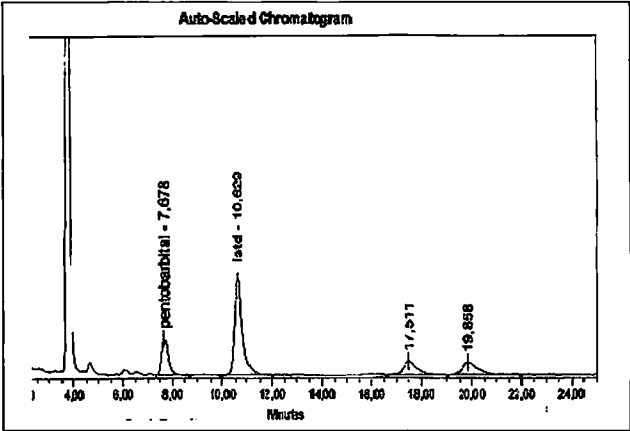
Chromatogrammen

Zie figuur 1 en 2.





Figuur 1: chromatogram van plasma gespiked met thiopental en clozapine (istd)



Figuur 2: chromatogram van plasma gespiked met pentobarbital en secobarbital (istd)

Tabel 1

Thiopental mg/l	Juistheid %	Herhaal- baarheid VC %	Reproduceer- baarheid VC %
4,57	99,5	1,9	1,6
11,43	96,6	0,5	3,9
22,85	99,1	2,3	2,4
45,67	99,2	1,2	3,2
Recovery 85%			
Bepalingsgrens 2,0 – 60,0 mg/l			

Tabel 2

Pentobarbital mg/l	Juistheid %	Herhaal- baarheid VC %	Reproduceer- baarheid VC %
1,0	107,7	2,7	4,5
2,6	101,1	3,0	4,5
8,0	96,6	3,0	2,9
12,0	95,1	1,1	6,1
Recovery 100%			
Bepalingsgrens 0,5 – 15 mg/l			

Validatie

De methode is gevalideerd zoals omschreven in de op dit moment geldende instructie in ons laboratorium. De validatie voor thiopental en pentobarbital voldoen aan de door ons gestelde eisen. De validatie parameters voor thiopental zijn gegeven in tabel 1, die voor pentobarbital in tabel 2.

Conclusie

De voorgestelde SPE methode is geschikt voor monstervoorbewerking van thiopental en zijn metaboliet pentobarbital. Inmiddels hebben wij de analyse voor deze componenten routinematig in gebruik genomen.