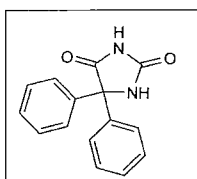
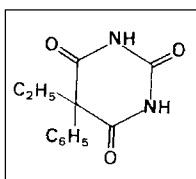


SPE monstervoorbewerking van Fenytoïne en Fenobarbital

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



Fenytoïne



Fenobarbital

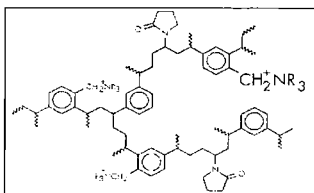
Inleiding

In ons laboratorium worden bloedspiegelmetingen van de anti-epileptica fenytoïne en fenobarbital routinematig uitgevoerd met behulp van de FLx. Dit gebeurt zowel ten behoeve van Therapeutic Drug Monitoring (TDM) als voor toxicologische doeleinden. Toxicische effecten van fenytoïne kunnen verwacht worden vanaf een totale plasmaconcentratie van 20-25 mg/l bij volwassenen. Verschijnselen zijn sufheid, tremoren, visusstoornissen en niet meer instaat zijn om te staan of lopen. Vanaf 50 mg/l ontstaat extreme sufheid, aritmieën, convulsies en soms coma. Vanaf 70 mg/l is er kans op overlijden. Fenobarbital is toxisch vanaf 60 mg/l. Overdosering hiervan geeft onderdrukking van het centrale zenuwstelsel, variërend van sedatie tot coma. Verder coördinatiestoornissen en ademhalingsdepressie

Om bij een eventuele uitval van de FLx toch de aanvragende arts te kunnen ondersteunen bij de therapie hebben wij voor deze geneesmiddelen een vervangende bepaling opgezet. Beide stoffen zijn uitstekend te isoleren uit plasma met behulp van solid phase extractie. Aansluitend worden de componenten gekwantificeerd met reversed phase chromatografie bij een golflengte van 215 nm.

Oasis MAX

Voor de bepaling van fenobarbital en fenytoïne wordt gebruik gemaakt van Oasis MAX extractie kolommen. MAX staat voor **M**ixed-mode-**A**nion-**e**Xchange en is een kolom speciaal ontwikkeld voor de extractie van componenten met zure eigenschappen. Het MAX kolommateriaal bezit zowel reversed phase als "anion exchange" eigenschappen. Aan het oppervlak van de fase bevinden zich quaternaire aminegroepen (dimethylbutylamine) die een hoge selectiviteit voor zure componenten bezitten. Na het opbrengen van het plasma bindt het geneesmiddel in eerste instantie aan het poly co-polymeer (divinylbenzeen-co-N-vinylpyrrolidone). Hierna wordt de kolom gewassen met een oplossing die 2% ammonia bevat. Hierdoor worden de zure componenten negatief geladen en vindt binding plaats aan de positief geladen quaternaire amine groepen. De zure component wordt hierdoor als het ware vastgeketend aan het kolommateriaal. Een groot voordeel hiervan is dat na het "locken" van het geneesmiddel aan de SPE fase men kan wassen met 100% methanol. Dit sterke elutiemiddel wast veel verontreinigingen van het kolommateriaal, terwijl de zure component achterblijft. Dit resulteert in zeer schone extracten. De binding tussen de zure component en het SPE materiaal kan worden verbroken door de kolom te wassen met 90% methanol in 2% azijnzuur. De azijnzuur zorgt ervoor dat de zure component weer neutraal wordt en in combinatie met de methanol van de kolom spoelt.



Structuur Oasis MAX

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 MAX 1cc (30mg) extractie cartridges (Waters, Etten-Leur, part. No. 186000366).

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.), 5 µm (Waters, Etten-Leur, part no. WAT 46970) in combinatie met een voorkolom Symmetry C8 Sentry Guard (20 x 3,9 mm i.d.), 5 µm (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 72-28. De flow bedraagt 1,3 ml/min. De detectie van fenytoïne en fenobarbital vindt plaats bij 215 nm.

Grondstoffen

- Kaliumdiwaterstoffosfaat (Bufa B.V.)
- Lichrosolv® Acetonitril (VWR International)
- Methanol p.a. (VWR International)
- Azijnzuur 100% p.a. (VWR International)
- Ammonia 25% p.a. (VWR International)
- Fosforzuur 85% p.a. (VWR International)
- Aqua destillata (Baxter)
- Fenobarbital.natrium (Bufa B.V.)
- Fenytoïne.natrium (Bufa B.V.)
- Secobarbital.natrium (Bufa B.V.)

Standaarden

Bereid stamoplossingen van fenytoïne (opl. A) en fenobarbital (opl. B) met concentratie 1,0 mg/ml in water.

Fenytoïne

- 5 mg/l: 10 µl oplossing A ad 2,0 ml blanco plasma
- 10 mg/l: 20 µl oplossing A ad 2,0 ml blanco plasma
- 20 mg/l: 40 µl oplossing A ad 2,0 ml blanco plasma

Fenobarbital

- 10 mg/l: 20 µl oplossing B ad 2,0 ml blanco plasma
- 20 mg/l: 40 µl oplossing B ad 2,0 ml blanco plasma
- 40 mg/l: 80 µl oplossing B ad 2,0 ml blanco plasma

Interne standaard

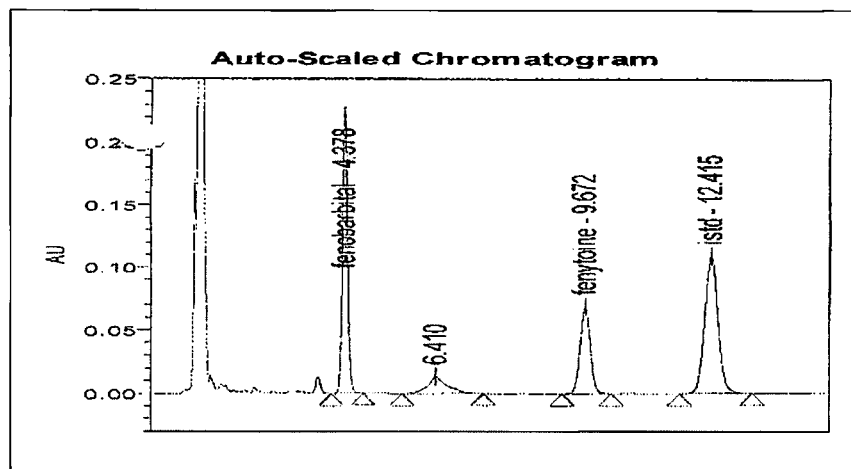
Secobarbital (1,0 mg/ml in water).

Uitvoering van de extractie

Voeg aan 1,0 ml plasma van standaarden, monsters en controles 20 µl fosforzuur 85% toe (verstoring geneesmiddelenwit interactie) en 40 µl van de interne standaard. Plaats de MAX extractie kolommetjes op de extractie manifold. Voer aansluitend de volgende stappen puntsgewijs uit.

Breng achtereenvolgens op de extractie kolommetjes

1. 1 ml methanol.
2. 1 ml water.
3. 0,2 ml plasma van standaard, monster of controle.
4. 1 ml 2% ammonia.
5. 1 ml methanol.



Figuur 1. Chromatogram van plasma gespiked met fenytoïne, fenobarbital en secobarbital

6. Plaats het aantal benodigde buisjes voor de elutie in de manifold.
7. 2 ml 90% methanol in 2% azijnzuur.
8. Damp droog onder een stroom van stikstof bij 40°C.
9. Neem het residu op in 200 µl loopmiddel en injecteer 50 µl.

De validatie

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

De conclusie

De voorgestelde SPE methode is geschikt voor de monstervoorbereiding van fenytoïne en fenobarbital. Ook is het gekozen HPLC systeem geschikt voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van beide componenten.

Literatuur

1. Chromatographic Columns and Supplies catalog: Waters Etten-Leur
2. Informatorium Medicamentorum 2005
3. De bepaling van anti-epileptica m.b.v. Solid Phase Extractie; Hai Holthuysen; Extract, jaargang 15, nummer 3

Fenytoïne mg/l	Herhaalbaarheid R.S.D. %
2,0	1,07
5,0	0,37
15,0	0,64
30,0	0,86
Recovery	100%
Juistheid	93%
Bepalingsgrens	0,5 – 40,0 mg/l

Tabel 1.

Fenobarbital mg/l	Herhaalbaarheid R.S.D. %
5,0	1,22
15,0	0,47
30,0	0,80
60,0	0,56
Recovery	93%
Juistheid	102%
Bepalingsgrens	1,0 – 80,0 mg/l

Tabel 2.