



## Morfine bepaling in plasma

**Hay Janssen en Hai Holthuysen**

*Laboratorium apotheek*

*Viecuri Medisch Centrum voor Noord-Limburg*

*Tegelseweg 210*

*5912 BL Venlo*

*hjanssen@viecuri.nl*

*hholthuysen@viecuri.nl*

### Inleiding

De werkzaamheden binnen een apotheek laboratorium kunnen grofweg worden onderverdeeld in twee kerntaken: de farmaceutische analyse, waarbij de nadruk ligt op de controle van grondstoffen en eigen bereidingen en de klinisch farmaceutische en toxicologische analyse met als speerpunten Therapeutic drug Monitoring en Toxicologie. De overblijvende tijd wordt besteed aan zaken als validatie, kwaliteitshandboek, afvalverwerking, kortom alle zaken die voor het reilen en zeilen van een laboratorium minstens zo belangrijk zijn, maar waar feitelijk te weinig tijd voor kan worden vrijgemaakt. Ik denk dat deze beschrijving voor veel laboratoria van toepassing is, uitzonderingen daargelaten natuurlijk. Praktisch houdt dit in dat de analisten binnen ons laboratorium 80% van hun tijd bezig zijn met het uitvoeren van routineanalyses, de overige 20% met randzaken als hierboven beschreven en dan heb ik het nog niet eens over de vakantieperiode. De grote toename in het aantal bepalingen en de eisen die hieraan worden gesteld zijn debet aan deze verhouding. Met andere woorden er blijft veel minder tijd over, voor zoals ik het altijd zeg "de krenten in de pap" wat ons vakgebied zo aantrekkelijk maakt.

### Krent = opzetten nieuwe bepaling

Toch vind ik het belangrijk dat onze analisten af en toe naar die krenten op zoek gaan. Het is een welkome afwisseling van de routine (die overigens in het geheel niet saai is). Maar veel belangrijker is het feit dat de analist in zijn zoektocht naar de krent weer gaat nadenken over essentiële zaken, die belangrijk zijn binnen ons vakgebied. Op het gebied van de chromatografie valt te denken aan zaken als:

- fysische en chemische eigenschappen van een component
- kolomkeuze
- loopmiddelsamenstelling
- extractie
- detectie

Door een juiste combinatie van bovenstaande punten moet het mogelijk zijn een HPLC-methode op te zetten voor iedere willekeurige component. Alleen ontbreekt het ons aan tijd met als consequentie dat met name nieuwe analisten en analisten op parttime basis zich deze expertise niet meer eigen kunnen maken. Deze kennis is juist noodzakelijk tijdens onze routine werkzaamheden. Alleen door het opdoen van ervaring uit ontwikkeling kunnen we scheidingsproblemen tijdens de routine op een flexibele en snelle manier te lijf gaan.

### Morfine in plasma = krent

Enige tijd geleden werd ons zomaar op een vrijdagmiddag een krent in de pap geworpen. De vraagstelling luidde: is het mogelijk om op zeer korte termijn een bepaling in plasma op te zetten voor morfine, morfine-3-glucuronide en morfine-6-glucuronide. Ons eerste antwoord was een beslist NEE. We waren niet bekend met screening van morfine in plasma en uit navraag bij andere laboratoria bleek dat dit inderdaad niet gebruikelijk was. Morfine bepalen in urine was wel geen probleem. Na wat overpeinzingen in het daaropvolgende weekend besloten we de uitdaging toch aan te nemen. Om redenen hierboven beschreven werd gekozen voor een analist die op dat moment de minste ervaring had opgedaan bij het uitzoeken van een nieuwe methode. Een uitstekend leermoment dus.

### Speerpunten

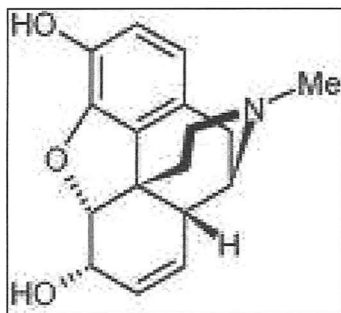
Er werd gekozen voor de volgende aandachtspunten

- aanschaf grondstoffen
- kolom
- loopmiddel
- extractie

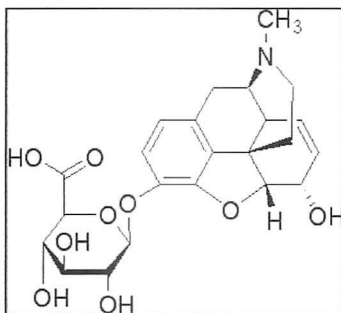
### Aanschaf grondstoffen

Bij aanschaf van de benodigde grondstoffen deed zich meteen het eerste probleem gelden. Morphine HCl was geen probleem, dat hadden we in huis. De beide glucuroniden natuurlijk niet. Dan maar bestellen bij Sigma/Aldrich. Helaas te vroeg gejuicht. Sigma/Aldrich had weliswaar de stoffen in hun catalogus staan, de levertijd bedroeg echter minimaal drie maanden vanuit Amerika. Doordat beide glucuroniden vallen onder de opiumwet moeten er allerlei lastige procedures worden gevolgd (invoerrechten e.d.) waardoor levering binnen drie maanden niet mogelijk

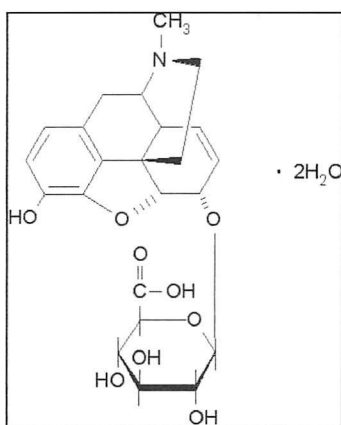
was. Tevens kwam aan het licht dat de morfine-6-glucuronide schrikbarend duur was en dus geen optie voor ons onderzoek. De laboratoriumapotheker zou via een andere weg zorgen voor een kleine hoeveelheid morfine-3-glucuronide. De waarde van het 6-glucuronide zou dan worden berekend op de 3-glucuronide er van uitgaande dat beide componenten dezelfde molaire extinctiecoëfficiënt hebben.



Morphine



Morphine-3-glucuronide



Morphine-6-glucuronide

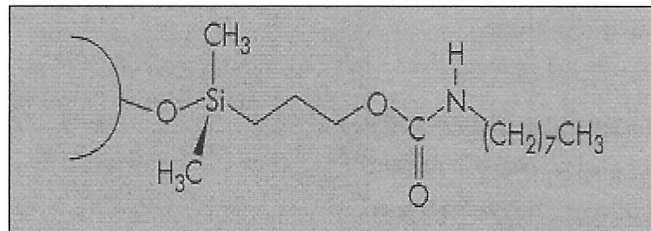
## Kolom

Op het laboratorium kan gebruik worden gemaakt van de volgende kolommen:

- Symmetry C8 (150x3,9mm), 5 µm
- SymmetryShield RP8 (150x3,9mm), 5 µm
- SymmetryShield RP18 (150 x 4,6mm), 3,5 µm

Welke kolom kan nu het beste gekozen worden? Uit de bovenstaande structuurformules van morfine en de twee glucuroniden kunnen we afleiden dat we te maken hebben met erg polaire componenten. De symmetry C8 kolom viel daarom onmiddellijk af, de verwachting was dat met name de glucuroniden hier nauwelijks retentie op zouden vertonen. De beide symmetryShield kolommen

bezitten een polaire carbamaatgroep, beter geschikt voor de analyse van polaire componenten. Daarnaast vertoont de symmetryshield een betere piekvorm voor polaire componenten wanneer gebruik wordt gemaakt van een loopmiddel dat weinig organische fase bevat. Zie volgende paragraaf.



carbamaatgroep

## Loopmiddel

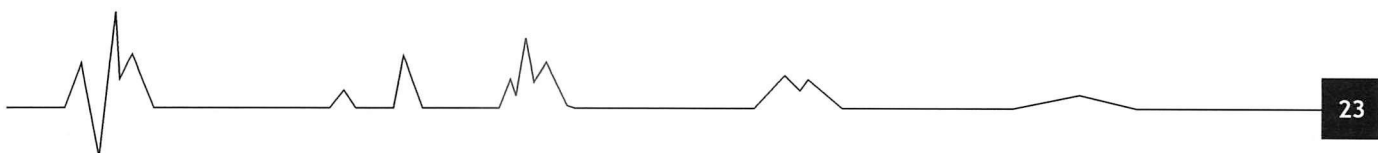
De eerste vraag die dan komt bovendrijven is, welke samenstelling moet het loopmiddel hebben. Kijkend naar de chemische eigenschappen van morfine en de beide glucuroniden hadden we al opgemerkt dat het componenten zijn met een grote polariteit. Omdat we in principe altijd gebruik maken van een apolaire stationaire fase betekent dit dat de morfine en de beide glucuronides weinig affiniteit zullen vertonen met deze fase. Om toch nog enige retentie te krijgen is het dus zaak weinig of geen organische fase aan het loopmiddel toe te voegen. Dit lijkt allemaal basis-kennis voor een ervaren analist, die over het algemeen het klappen van de zweep wel kent, maar voor iemand met minder ervaring is dit allemaal niet zo vanzelfsprekend.

## Extractie

In principe kan gebruik worden gemaakt van vaste fase extractie (SPE) of de klassieke vloeistof-vloeistof extractie. Omdat in dit geval het hele laboratorium weinig ervaring had met het opzetten van een geheel nieuwe methode met SPE werd hiervoor gekozen. Als uitgangspunt werd de vaste fase extractie gekozen die wordt gebruikt bij de extractie van cortisol uit urine. Er werden twee SPE materialen uitgetest te weten Oasis HLB en Oasis MCX.

## Uitvoering

Met bovenstaand onderzoek werden eigenlijk twee vliegen in een klap geslagen. Op de eerste plaats natuurlijk een betrouwbare methode voor de bepaling van morfine en zijn metabolieten in plasma ter ondersteuning van arts en patiënt. Voor de uitvoerende analist in kwestie was het belangrijk kennis te maken met alle facetten die komen kijken bij het op poten zetten van een nieuwe bepaling. In



een tijdsbestek van twee weken (eigenlijk een week door parttime dienst verband) werden twee kolommen uitgetest in combinatie met diverse loopmiddelen. De extractie werd geoptimaliseerd uitgaande van de beschreven begincondities. Alle veranderingen werden uitvoerig berekend en theoretisch geïnterpreteerd alvorens toe te passen. Door op deze manier te werk te gaan kwamen alle bovengenoemde aspecten, belangrijk voor het opzetten van een HPLC methode uitvoerig aan bod, zowel in theorie als praktijk. En ondanks het feit dat we slechts twee monsters kregen aangeboden ter bepaling van morfine was het voor onze analist een zeer leerzaam project geweest. Minpunt in het gehele onderzoek was dat het uiteindelijk niet is gelukt beslag te leggen op beide metabolieten.

## Materialen en methode

### Monster voorbereiding

De monstervoorbereiding wordt uitgevoerd met een extractie Manifold. (Waters, Etten-leur, part. No. WAT200606). De SPE-kolommetjes die worden gebruikt zijn Waters oasis HLB 3cc (60mg) extractie cartridges (Waters, Etten-Leur, part. No. WAT094226).

### HPLC

Het HPLCsysteem bestaat uit een Alliance 2695 Separation Module met een 996 Photo Diode Array detector. De analytische kolom is een Symmetryshield RP8 (150 x 3,9 mm i.d), 5µm (Waters, Etten-Leur, part no. WAT200655) in combinatie met een voorkolom SymmetryShield RP8 Sentry



Guard (20 x 3,9 mm i.d.), 5µm (Waters, Etten-Leur, part. No. WAT200675). De loopvloeistof bestaat uit een 0,02 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer pH 6,0. De flow bedraagt 1,0 ml/min. De detectie vond plaats bij 205 nm.

## Grondstoffen

Kaliumdiwaterstoffsosfaat (Bufa B.V.)  
Methanol p.a. (VWR International)  
Aceton p.a. (VWR International)  
Ethylacetaat (VWR International)  
Fosforzuur 85% p.a. (VWR International)  
Aqua destillata (Baxter)  
Morfine HCl (Bufa B.V.)  
Codeïne HCl (Bufa B.V.)

## Standaarden

Maak standaarden in plasma met concentraties morfine 0,2 – 0,5 – 1,0 mg/l.

## Interne standaard

Codeïne HCl (0,05 mg/ml in water).

## Uitvoering van de extractie

Voeg aan 4,0 ml plasma van standaarden en monsters 100 µl interne standaard toe.

Plaats de HLB extractie kolommetjes op de extractie manifold.

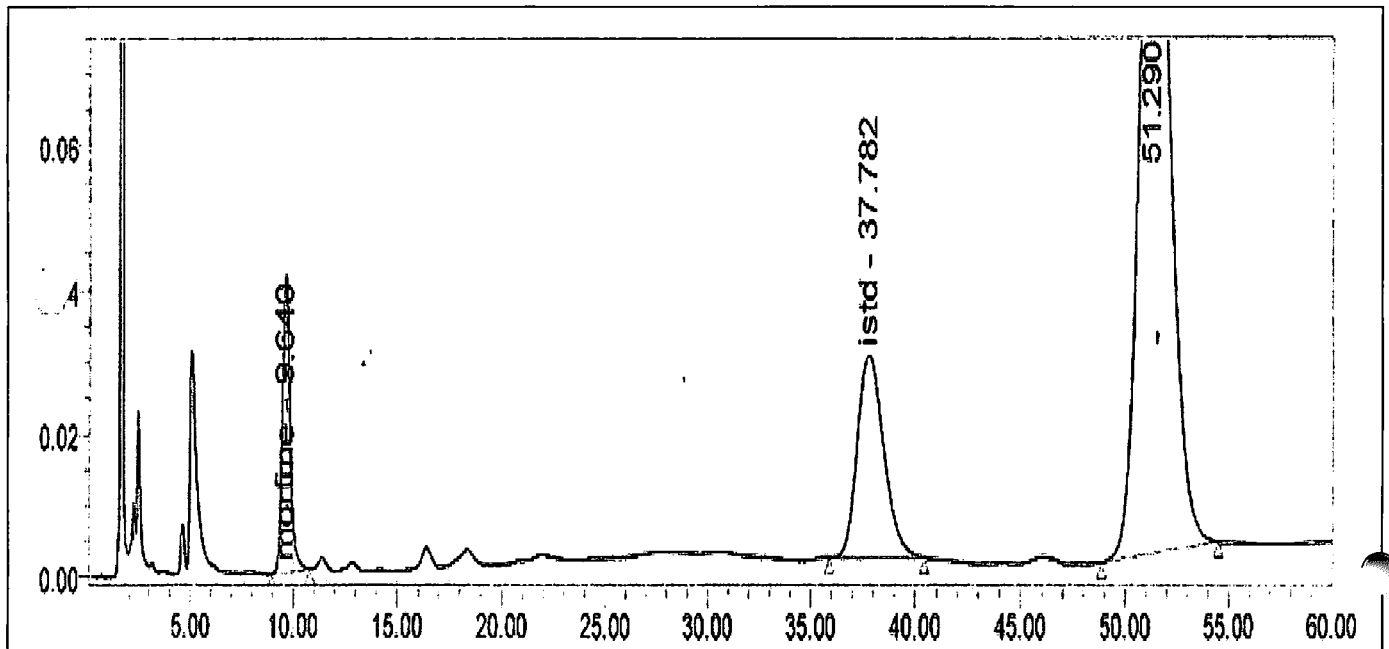
Voer aansluitend de volgende stappen puntsgewijs uit.

Breng achtereenvolgens op de extractie kolommetjes

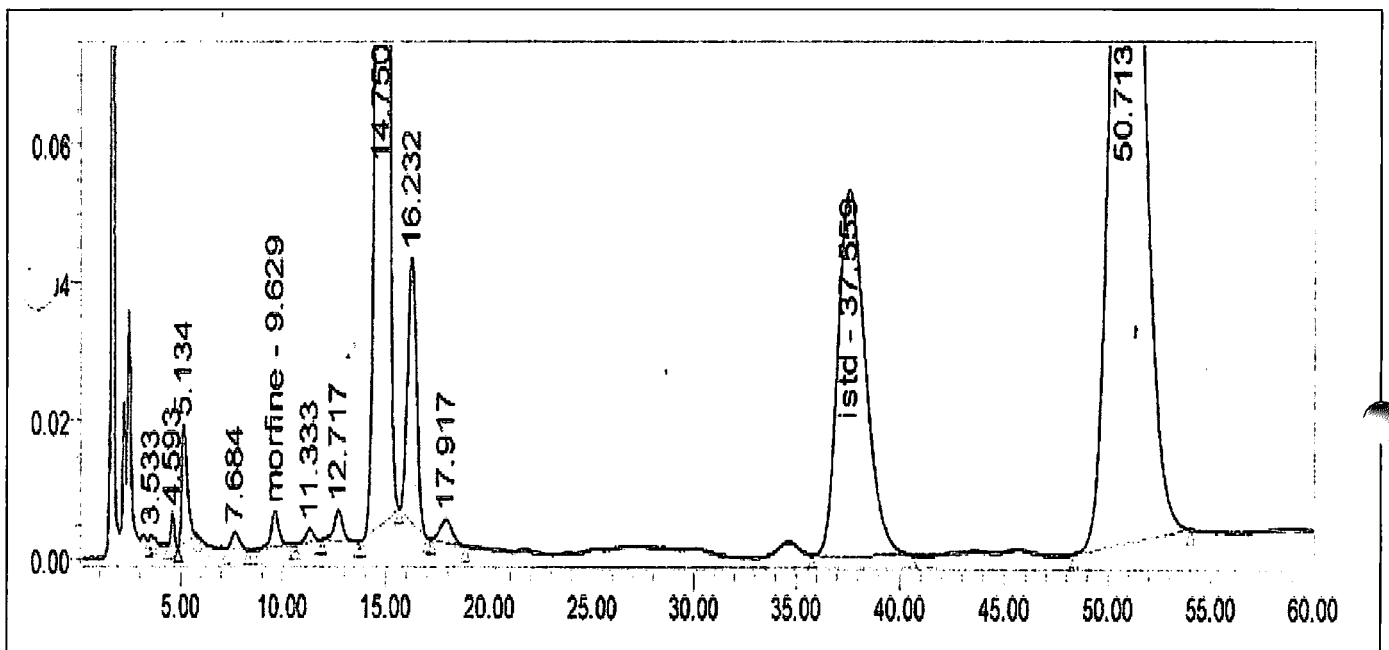
1. 3 ml methanol.
2. 3 ml water.
3. 3 ml plasma van standaard of monster.
4. 3 ml 5% aceton in water.
5. Plaats het aantal benodigde buisjes voor de elutie in de manifold.
6. 2 ml ethylacetaat.
7. Damp droog onder een stroom van stikstof bij 40 °C.
8. Neem het residu op in 120 µl loopmiddel en injecteer 90 µl.



## De chromatogrammen



Chromatogram van een standaard 0,5 mg/l



Chromatogram van patiënt.

Op retentie 7,68 min. bevindt zich een piekje met een spectrum overeenkomstig dat van morfine. Mogelijk is dit een van de glucuronides

