



Levetiracetam (Keppra®) in plasma m.b.v Gaschromatografie en Solid Phase Extractie

Hai Holthuysen

Viecuri Medisch Centrum voor Noord-Limburg

Laboratorium apotheek

Tegelseweg 210

5912 BL Venlo

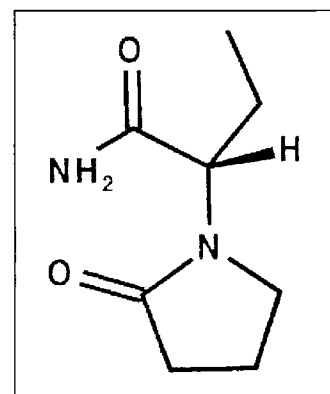
hholthuysen@viecuri.nl

Inleiding

Het aantal bepalingen ten behoeve van Therapeutic Drug Monitoring neemt nog steeds toe. De analist in het apotheek laboratorium moet in staat zijn een uitgebreid scala van verbindingen te kunnen analyseren in een moeilijke matrix, meestal serum of plasma. De variatie is groot. We hebben te maken met zure, basische of neutrale stoffen, die weer kunnen worden opgedeeld in stoffen met polaire of minder polaire eigenschappen. Veel laboratoria zoeken bij een bepaling hun toevlucht tot reversed phase vloeistofchromatografie met UV-detectie, al of niet gebruikmakend van een Photo Diode Array Detector voor structuur-opheldering. De UV-detector wordt het meest gebruikt in de apotheek en heeft als voordeel dat het een universele detector is, te gebruiken voor alle componenten met UV absorptie. Maar wat als we worden geconfronteerd met een component met geen of nauwelijks UV-absorptie? De wat kleinere laboratoria hebben meestal nog geen massaspectrometer in huis. Vaak wordt de makkelijkste weg gekozen, wat zoveel betekent als de bepaling opsturen naar een extern laboratorium. Echter, we hebben vaak nog wel een techniek in huis die de laatste jaren naar mijn mening onterecht naar de achtergrond is geschoven. Ik heb het over de gaschromatograaf (meestal uitgerust met FID). Deze techniek wordt in veel laboratoria nog uitsluitend gebruikt voor de bepaling van vluchtige verbindingen en incidenteel een verdwaalde eigen bereiding. Maar ook voor het meten van bloedspiegels kan de techniek wel degelijk van nut zijn, zeker als de therapeutische breedte van het geneesmiddel in het mg per liter gebied ligt. Een bijkomend voordeel is dat de vaak al overbezette HPLC wordt ontlast. En last but not least het blijft een fantastische techniek met een enorm scheidend vermogen. Onderstaand kunnen je een artikel lezen over de bepaling van levetiracetam in plasma, waarbij zowel gebruik werd gemaakt van de structuur en chemische eigenschappen van de te bepalen component als de voordelen van gaschromatografie.

Structuur levetiracetam

Zoals bijna onmiddellijk uit de structuur van levetiracetam is op te maken gaat het om een verbinding met nauwelijks UV absorptie. Dit wordt bevestigd door gegevens uit de Clarke. Het molecuul herbergt daarentegen een ring in zijn structuur, die het geschikt maakt voor detectie met behulp van een FID. (vrije CH₂ groepen).



Bijkomend voordeel is dat de therapeutische breedte ligt in het mg per liter gebied. Wij houden aan 7 - 20 mg/l.

GLC-systeem

Er wordt gebruik gemaakt van een HP6890 Gaschromatograaf met FID. Er is gebruik gemaakt van de volgende instellingen.

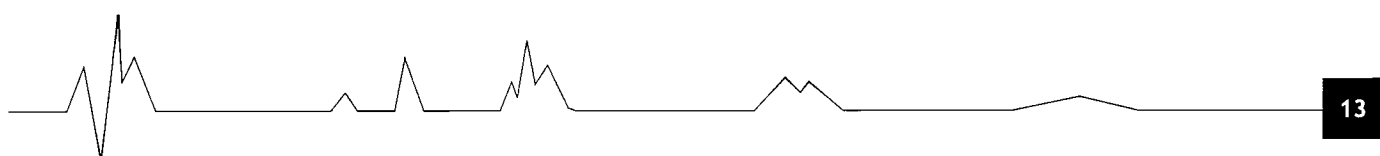
Kolom	: HP1 methylsiloxaan 30 m x 0,53 mm, 2,65 µm filmdikte
Oven	: 120 °C → 15 °C/min. → 275 °C → 5 min. hold
Injectietemperatuur	: 275 °C
Injectievolume	: 2 µl → split 6:1
Detectietemperatuur	: 300 °C
Flow	: 10 ml/min. constant flow
Draaggas	: Helium

Grondstoffen

Methanol p.a. (VWR International)
Fosforzuur 85% p.a. (VWR International)
Humaan blanco plasma

Materialen

Oasis HLB 1 cc 30 mg extractiecartridges (WAT094225)
Extractie manifold (WAT200606)



Standaarden

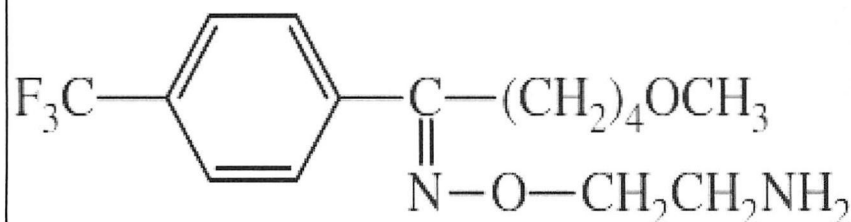
Uitgaande van een stamoplossing van levetiracetam met concentratie 1,0 mg/ml in methanol.

10 mg/l	: 10 µl stamoplossing ad 1,0 ml blanco plasma.
20 mg/l	: 20 µl stamoplossing ad 1,0 ml blanco plasma.
30 mg/l	: 30 µl stamoplossing ad 1,0 ml blanco plasma.

Interne standaard

Fluvoxamine 1,0 mg/ml in methanol.

Het gebruik van fluvoxamine lijkt misschien niet helemaal logisch, het is een component met een totaal verschillende structuur als levetiracetam. Fluvoxamine bezit echter wel een groot aantal vrije CH₂ groepen die garant staan voor een goed signaal bij gebruik van een FID. Fluvoxamine bezit daarnaast in dezelfde concentratie een overeenkomstige respons als levetiracetam.

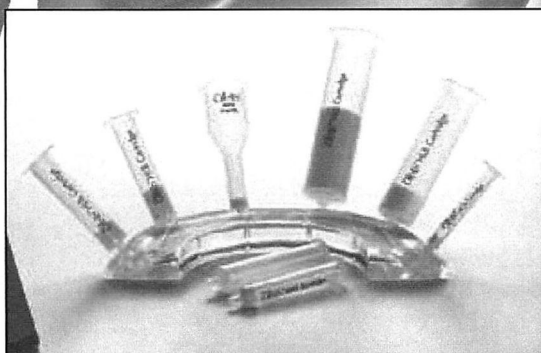


FLUVOXAMINE

Uitvoering

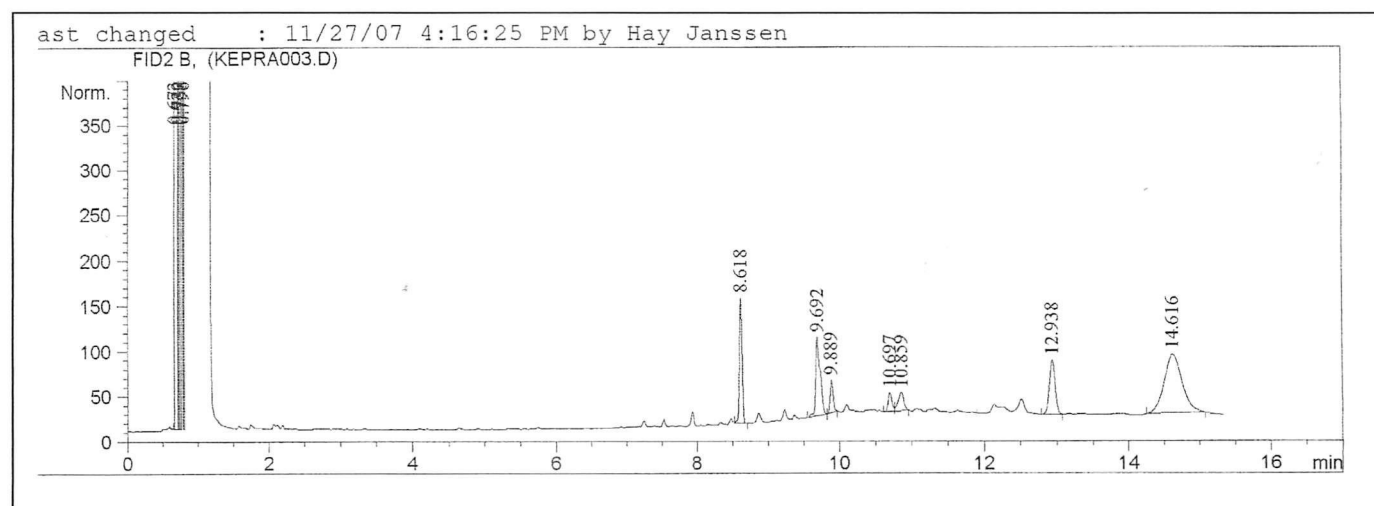
Neem 1,0 ml plasma van standaard, controle of monster
Voeg toe 20 µl interne standaard en 20 µl fosforzuur 85%.
Vortex gedurende 30 seconden.
Plaats de HLB 1 cc 30 mg extractiekolommetjes op de manifold.

- Was met 1 ml methanol.
- Was met 1 ml water.
- Breng 0,4 ml plasma op.
- Was met 1 ml water.
- Elueer met 2 ml methanol.
- Damp droog onder stikstof bij 40 °C.
- Neem het residu op in 90 µl methanol.



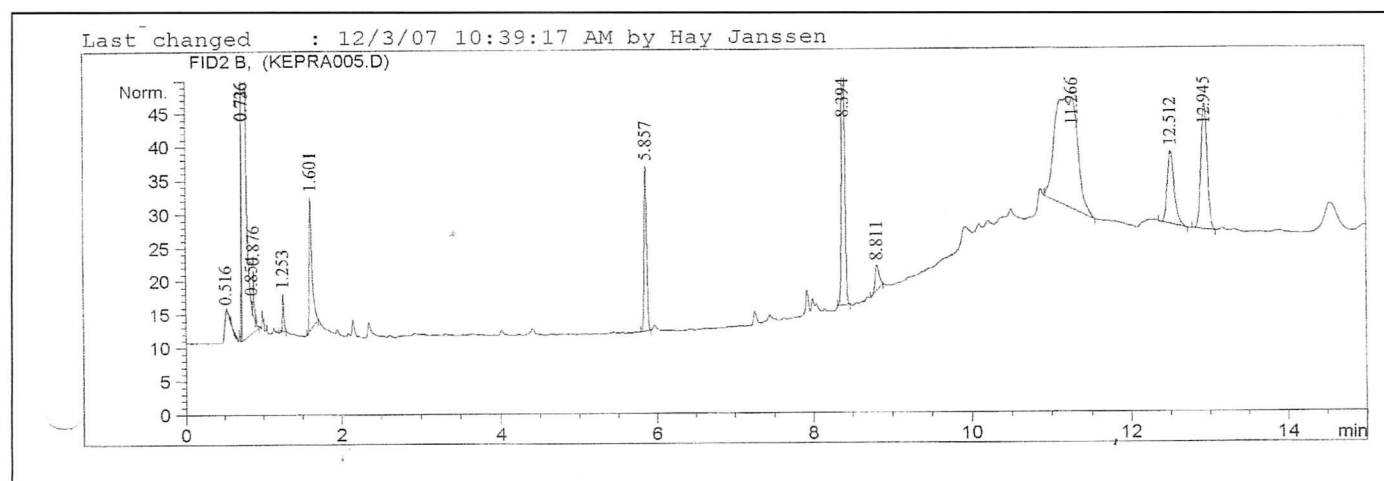
Chromatogram 1

Blanco plasma



Chromatogram 2

Plasma standaard met concentratie 10 mg/l



Retentietijden

Levetiracetam	5,86 minuten
Fluvoxamine	8,39 minuten

Normaalgebied

Levetiracetam	7 – 20 mg/l
---------------	-------------

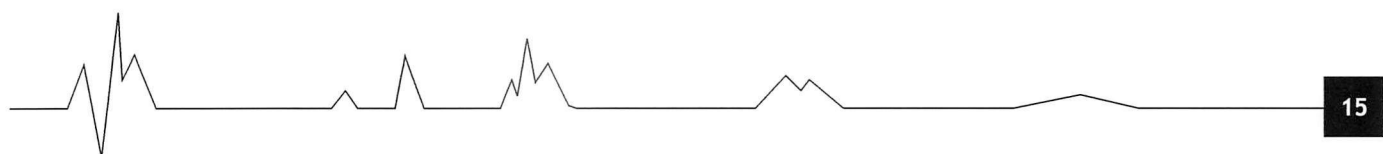
Validatie

De methode werd uitgebreid gevalideerd volgens het vigerende validatieprotocol.

De volgende validatieparameters kwamen aan de orde:

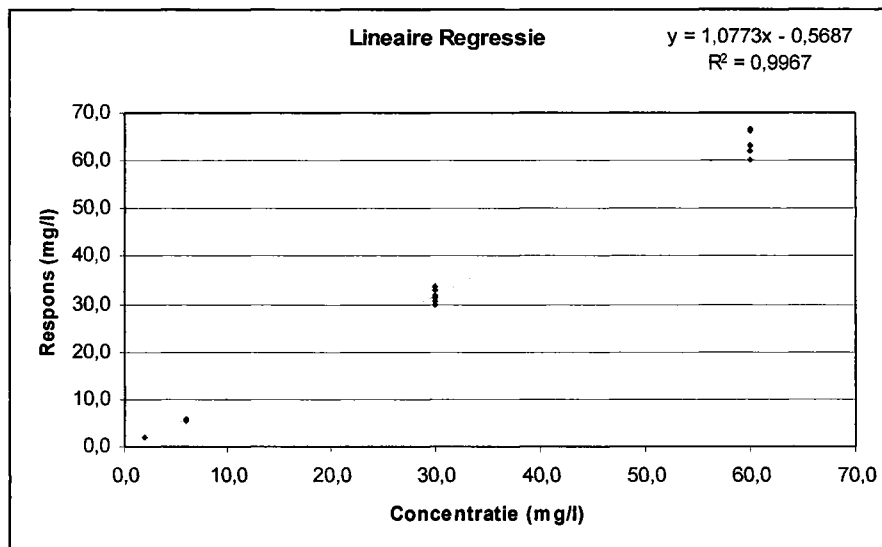
- Specificiteit.
- Selectiviteit.
- Lineairiteit.
- Herhaalbaarheid.
- Juistheid.
- Onderste bepalingsgrens.
- Recovery.

De methode voldeed aan de criteria voor specificiteit en selectiviteit. Het blanco plasma vertoont geen storing. De bepaling is selectief voor carbamazepine, 10,11-



carbamazepine-epoxide, lamotrigine, mono-OH-carbazepine, fenytoïne, fenobarbital, ethosuximide en gabapentine. Het lineair bereik van de methode ligt tussen de 2 en 80 mg/l. De herhaalbaarheid werd in zesvoud getest voor de concentraties, 2, 6, 30 en 60 mg/l. Alle concentraties vielen ruimschoots binnen de eis die aan de R.S.D. werd gesteld, te weten < 15%. De juistheid van de methode bedraagt 107%, gemeten uitgaande van bovenstaande concentraties, ieder in zesvoud bepaald. Dit is visueel zichtbaar gemaakt in de onderstaande figuur en tabel.

2,0	1,867000
2,0	1,893000
2,0	1,751000
2,0	1,754000
2,0	1,866000
2,0	2,086000
6,0	5,277000
6,0	5,633000
6,0	5,635000
6,0	5,927000
6,0	5,572000
6,0	5,546000
30,0	33,060000
30,0	30,420000
30,0	33,680000
30,0	29,810000
30,0	31,540000
30,0	31,900000
60,0	66,500000
60,0	60,190000
60,0	66,540000
60,0	62,000000
60,0	66,180000
60,0	63,160000



De onderste bepalingsgrens werd vastgelegd op een concentratie van 1 mg/l. De recovery van de methode bedraagt 92%.

Conclusie

De bovenstaande methode voor de bepaling van levetiracetam is bruikbaar voor het beoogde doel. Welliswaar ligt de juistheid van de methode aan de hoge kant, de gestelde eis (90-110%) wordt echter ruimschoots gehaald. De onderste bepalingsgrens (1 mg/l) ligt aan de hoge kant. In de praktijk zijn concentraties lager dan deze waarde wel te meten, de relevantie hiervan is echter discutabel. Het doel waarvoor de bepaling werd ontwikkeld is ruimschoots behaald. Een snelle methode op de gaschromatograaf met een eenvoudige extractie.