



Bepaling van nifedipine in plasma m.b.v. SPE en HPLC

*Y.N. Wempe-van Tilborg, M.A. ter Laak,
C.C.M. van den Beemd-Vergouwen, N.E. van 't Veer*
Farmatoxlab Amphia Ziekenhuis, Breda

Samenvatting

Nifedipine is een calciumantagonist en behoort tot een groep chemisch verwante middelen, de dihydropyridines. Nifedipine wordt gebruikt bij de behandeling van cardio-vasculaire aandoeningen en bij dreigende vroeggeboorte als weeënremmer. In dit artikel wordt een bepalingmethode voor nifedipine in humaan plasma beschreven. In deze methode wordt gebruik gemaakt van high-performance liquid chromatography (HPLC) met diode-array detectie (DAD) bij 238 nm. Chromatografische scheiding wordt uitgevoerd met een C18 kolom (150x3,9 mm, 3 µm) en een C8 voor-kolom bij een kolomtemperatuur van 45 °C en een mobiele fase van water en acetonitril (60:40 v/v). Als interne standaard wordt gebruik gemaakt van nitrendipine. Monstervoorbewerking wordt uitgevoerd door middel van solid-phase extractie (SPE), gebruikmakend van Speeddisk PolarPlus C18[®] kolommen. Nifedipine wordt in het lichaam omgezet via cytochroom P450 3A4 (CYP3A4) tot de in-actieve metaboliet oxidized nifedipine. Omdat nifedipine ontleedt onder invloed van daglicht dient tijdens de bepaling zoveel mogelijk gewerkt te worden in een donkere ruimte met natriumverlichting. De methode is ontworpen om nifedipine te scheiden van de metaboliet (oxidized nifedipine), het fotodegradatieproduct en de meest voorkomende co-medicatie. De methode is gevalideerd voor een meetgebied van 10-200 µg/l (recovery > 90%, juistheid 90-110%, variatiecoëfficiënt herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid < 15%).

Inleiding

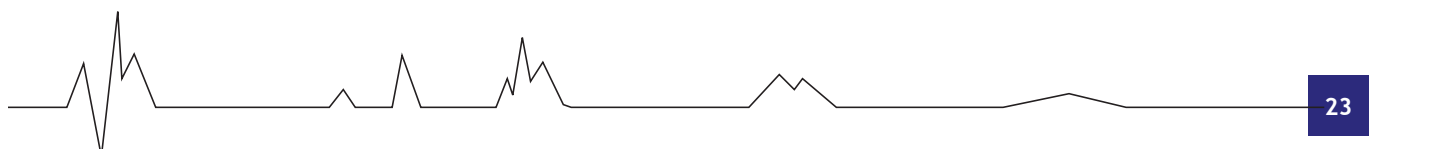
Nifedipine wordt gebruikt bij de medicamenteuze behandeling van cardiovasculaire aandoeningen en bij dreigende vroeggeboorte als weeënremmer [1]. Over de optimale dosering van nifedipine bij deze laatste indicatie verschillen de richtlijnen [2,3]. Om meer te kunnen zeggen over de farmacokinetiek van nifedipine bij zwangere vrouwen is een farmacokinetisch onderzoek opgezet waarbij patiënten gedurende 3-9 dagen een standaarddosis nifedipine krijgen. Op basis van farmacokinetische parameters wordt getracht het doseerregime van nifedipine bij dreigende vroeggeboorte te optimaliseren. In het kader van dit onderzoek is een

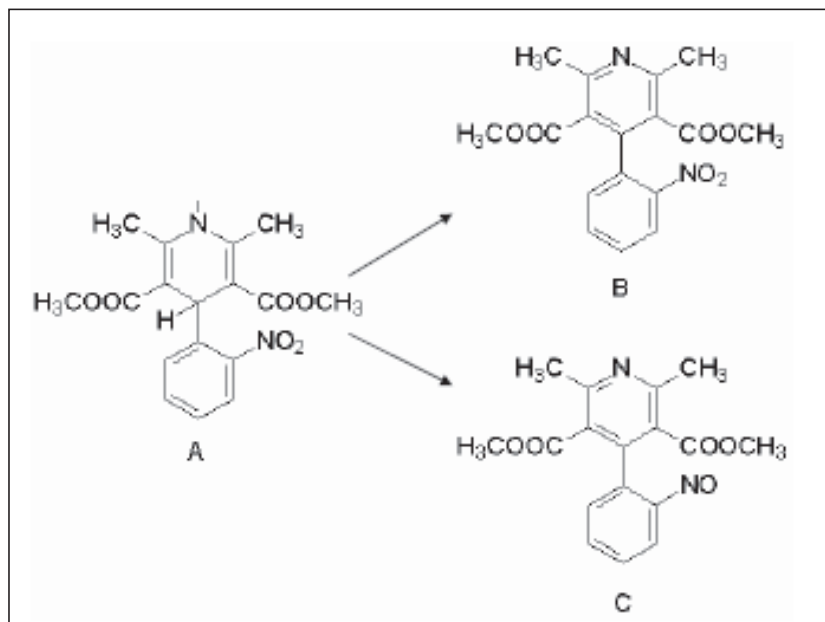
methode opgezet om de bloedspiegel van nifedipine in plasma te kunnen bepalen.

Nifedipine is een calciumantagonist en behoort tot een groep chemisch verwante middelen, de dihydropyridines [1]. Nifedipine wordt in het lichaam omgezet via cytochroom P-450 3A4 (CYP3A4) naar oxidized nifedipine, welke ook wel bekend is onder de naam dehydronifedipine (2,6-dimethyl-4-(2'-nitrophenyl)-3,5-pyridinecarboxylic acid dimethyl ester), de belangrijkste (niet-actieve) metaboliet [4,5,6,7,8,9]. Omdat nifedipine lichtgevoelig is, is er tevens een fotodegradatieproduct waar rekening mee gehouden moet worden: de 4-(2'-nitrosophenyl)-pyridine homologo [5,7,8,9] (zie figuur 1).

Methodeontwikkeling

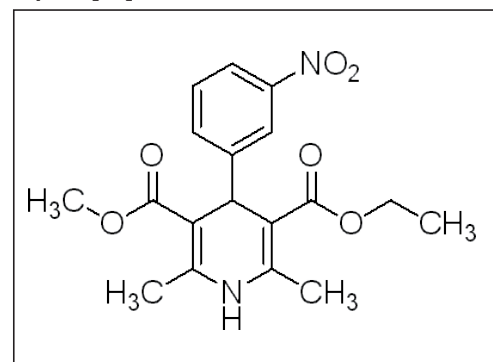
Vanwege ontleding van nifedipine onder invloed van daglicht is het van belang dat alle handelingen uitgevoerd worden in een donkere ruimte onder natriumverlichting [5,7,8]. Voor de bepaling is gekozen voor een high-performance liquid chromatography (HPLC)-methode met diode-array detection (DAD) en voor een solid-phase extraction (SPE)-voorbewerking. Voor de HPLC-methode wordt een standaard C18-kolom gebruikt met een water/acetonitril-eluens. Het gebruik van een buffer is niet nodig, omdat nifedipine een pKa heeft <1 en een zwakke base is [10]. Als interne standaard is gekozen voor nitrendipine (zie figuur 2) welke, net als nifedipine, tot de dihydropyridines behoort [1,11]. Vanwege mogelijke aanwezigheid van de metaboliet en fotodegradatieproduct in patiëntenmonsters is gezocht naar een methode waarbij alle drie de pieken van elkaar gescheiden worden. Door te variëren met de samenstelling van het eluens en de kolomtemperatuur kunnen de drie pieken gescheiden worden. Als nadeel kan de relatief lange retentietijd worden aangemerkt (runtijd 30 minuten). Storing door de meest voorkomende co-medicatie is onderzocht (paracetamol, heparine, erytromycine, atosiban, betamethason, temazepam, oxazepam). Deze co-medicatie stoort de bepalingmethode niet. Bij het opzetten van een SPE-methode zijn verschillende SPE-kolommen van Waters en Baker uitgeprobeerd [8,10,12]. Vanwege de hogere opbrengst en betere piekvorm is gekozen voor de Speeddisk PolarPlus C18[®] kolommen van Baker.





◀ **Figuur 1. Structuurformules van nifedipine (A), oxidized nifedipine (B) en het fotodegradatieproduct van nifedipine (C) [13].**

Figuur 2. Structuurformule van nitrendipine [14]. ▼



Materiaal en methode

Chemicaliën

Nifedipine, minimum 98% TLC, N7634-1G (Sigma)
 Nitrendipine, >95%, N144-25MG (Sigma)
 Oxidized Nifedipine, ~ 95% HPLC, UC167-5MG (Sigma)
 Methanol absolute HPLC supra-gradient, cat no 13683501 (Biosolve)
 Acetonitrile HPLC supra-gradient, cat no 01203501 (Biosolve)
 Ortho-fosforzuur 85% pro analyse, art nr 1.00573.1000 (Merck)

Apparatuur

HPLC-systeem 10A (Shimadzu)
 Diode Array Detector SPD-M10A VP (Shimadzu)
 Kolomoven CTO-10 AC VP (Shimadzu)
 HPLC-kolom Atlantis C18, 150 mm x 3,9 mm, 3 µm, artnr 186001317 (Waters)
 HPLC-voorkolom Symmetry C8, artnr WAT054250 (Waters)
 Concentrator VLM EC2 (droogdampblok)
 Vacuumpomp type N86KT.18 (KNF)
 Vortex-2 genie (Scientific Industries)
 Natriumlamp SON Pro 50W (Philips)
 Chalmit Lighting 70W SON, cat ref: NEXI/070/MS (Nexxus Industrial)
 Speeddisk PolarPlus C18® kolommen (Baker)

HPLC instellingen

Flow: 1 ml/min
 Detectie: UV 238 nm
 Kolomtemperatuur: 45°C
 Injectievolume: 50 µl
 Eluens: water:acetonitril (60:40 v/v)

Standaarden

Nifedipine stockoplossing 100 mg/l in acetonitril:water (1:1 v/v) (opslag -20 °C). Voor gebruik 10x verdunnen met water (10 mg/l) (vers).

Nitrendipine stockoplossing 15 mg/l in acetonitril:water (1:3 v/v) (opslag -20°C).

Calibratieoplossingen nifedipine (vers bereiden)

Level 1 (≡ 10 µg/l): 2,0 ml verdunde stock tot 100,0 ml met water (0,2 mg/l nifedipine)
 Level 2 (≡ 25 µg/l): 5,0 ml verdunde stock tot 100,0 ml met water (0,5 mg/l nifedipine)
 Level 3 (≡ 50 µg/l): 5,0 ml verdunde stock tot 50,0 ml met water (1,0 mg/l nifedipine)
 Level 4 (≡ 100 µg/l): 5,0 ml verdunde stock tot 25,0 ml met water (2,0 mg/l nifedipine)
 Level 5 (≡ 200 µg/l): 10,0 ml verdunde stock tot 25,0 ml met water (4,0 mg/l nifedipine)

Controleoplossingen nifedipine (vers bereiden)

Laag (≡ 15 µg/l): 3,0 ml verdunde stock tot 100,0 ml met water (0,3 mg/l nifedipine)
 Hoog (≡ 150 µg/l): 3,0 ml verdunde stock tot 10,0 ml met water (3,0 mg/l nifedipine)

Monstervoorbewerking

Calibratielijijn:
 1 ml blanco humaan plasma + 50 µl calibratieoplossing (level 1 t/m 5) + 20 µl IS nitrendipine.

Controlemonsters:
 1 ml blanco humaan plasma + 50 µl controleoplossing (laag / hoog) + 20 µl IS

Patiëntmonsters:

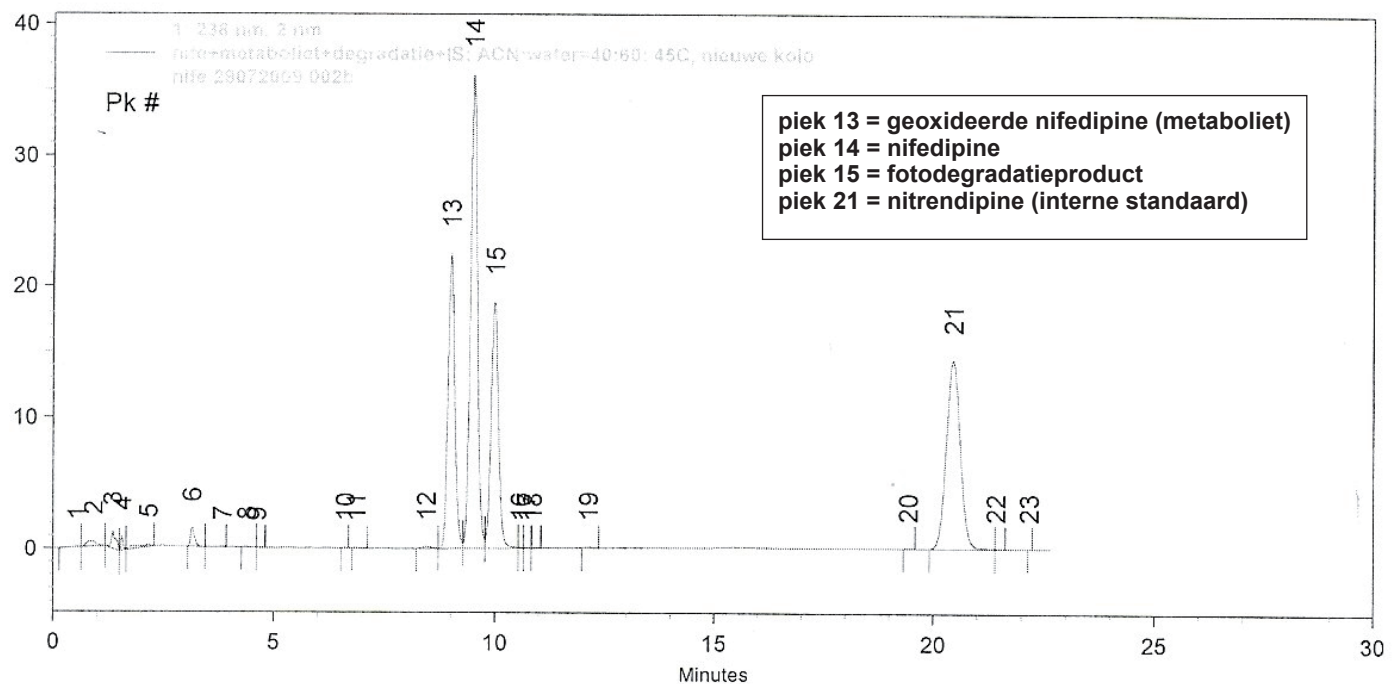
- plasma ontdooien en centrifugeren (10 min 3000 rpm)
- plasma overpipetteren in een schone buis en homogeniseren (vortex)
- 1 ml plasma + 50 µl water + 20 µl IS

Solid Phase Extractie (SPE)

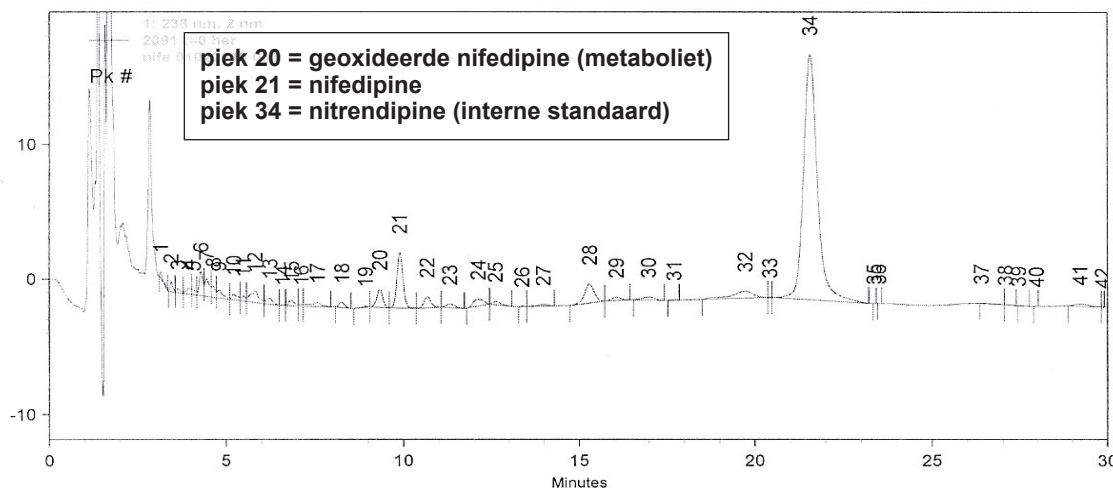
- Conditioneren met 2 ml methanol 100%
- Conditioneren met 2 ml water (niet droog laten lopen)
- 1 ml calibratieoplossing / controlemonster / patiëntmonster opbrengen
- wassen met 2 ml water (polaire verbindingen zoals zouten wegwassen)

- wassen met 2 ml fosforzuur 0,01% (eiwit-nifedipine verbinding verbreken)
- wassen met 2 ml methanol 5% (licht apolaire verbindingen wegwassen)
- extra vacuüm
- vervang opvangbuizen
- elueren met 1 ml methanol 100% (neemt apolaire verbindingen mee (nifedipine en verwante verbindingen))
- extra vacuüm
- droogdampen bij 40 °C tot alle methanol verdampt is (ca. 1 uur)
- oplossen in 100 µl eluens
- injecteren 50 µl op HPLC

Resultaten



▲ **Figuur 3: Chromatogram van een mengstaandaard van nifedipine, geoxideerd nifedipine, het fotodegradatieproduct en de interne standaard t.b.v. vaststellen retentietijden.**



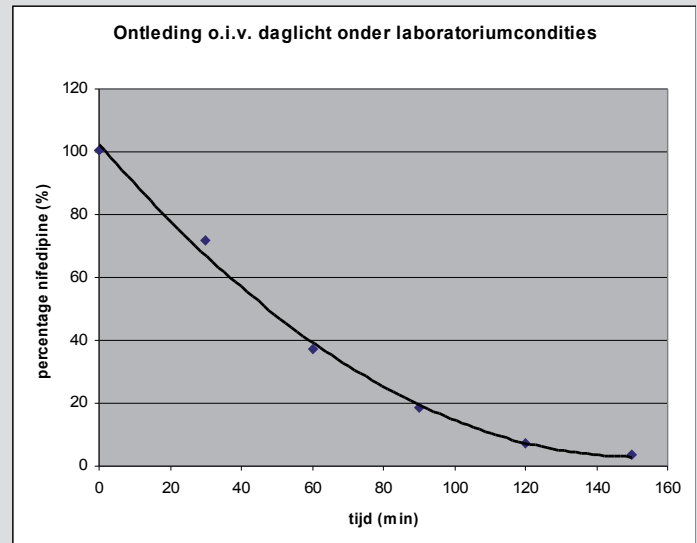
◀ **Figuur 4: Chromatogram van een patiëntmonster.**

Stabiliteit in licht

De stabiliteit van nifedipine in licht is onderzocht door een oplossing in indirect daglicht (achter het raam in het laboratorium) te zetten en te injecteren op t=0, t=30 min, t=60 min, t=90 min, t=120 min en t=150 min. Na 1 uur is nifedipine voor ca. 63% ontleed, na 2 uur is er ca. 93% ontleed.

Stabiliteit bij warmte

De stabiliteit in het droogdampblok (40 °C) in een zuurkast (licht uit) is onderzocht terwijl stikstof wordt overgeblazen. Vanaf het moment dat een monster is drooggedampt is elke 30 minuten de concentratie nifedipine gemeten tot 120 minuten. Er is geen afname van de nifedipineconcentratie tussen t=0 en t=120 minuten. De stabiliteit in de HPLC (afgesloten donkere autosampler) is onderzocht gedurende 24 uren. Dit leidt niet tot afname van de nifedipineconcentratie.



Validatiegegevens:

Concentratie (µg/l)	Juistheid % (n=6) (eis 90-110%)	Herhaalbaarheid VC % (n=6) (eis < 15%)	Reproduceerbaarheid VC % (n=3) (eis < 15%)
10 (LLOQ)	108	2,9	11,6
30 (3x LLOQ)	97	4,0	3,2
80 (midden)	95	7,9	1,5
160 (80%)	94	3,5	6,9

Onderste bepalingsgrens = 10 µg/l

Bovenste bepalingsgrens = 200 µg/l

Concentratie (µg/l)	Recovery % (n=6) (eis > 75%)
nifedipine 30	105
nifedipine 160	93
nitrendipine (IS)	111

Conclusie en discussie

Voor de bepaling van nifedipine in humaan plasma is deze bepaling geschikt. Vanwege de snelle ontleding onder invloed van licht is het belangrijk om zoveel mogelijk in een donkere ruimte met natriumverlichting te werken.

Gevonden dalspiegels van geïncubeerde studiepatiënten (dosering 4 maal daags 20 mg nifedipine) lagen tussen 7 (<10) µg/l en 38 µg/l. Om deze reden is het van belang om de validatie van deze methode in de toekomst meer te richten op het lagere concentratiegebied.

Vanwege de moeilijke beschikbaarheid en hoge prijs van humaan plasma ten opzichte van kalfsserum en om het aantal handelingen bij monstervoorbereiding te verminderen is het wenselijk een vervolgonderzoek te doen naar nifedipinespiegels in serum.



Reference List

1. <http://www.kennisbank.knmp.nl/index.asp>. Informatorium Medicamentorum. Nifedipine. Mei 2010.
2. Nederlandse Vereniging voor Obstetrie en Gynaecologie (NVOG)-richtlijn 'Dreigende vroeggeboorte'. Richtlijn 3. November 2004.
3. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG) Clinical Guideline No. 1B. Tocolytic drugs for women in preterm labour. October 2002.
4. <http://www.sigmaaldrich.com>. UC167 oxidized nifedipine. Mei 2010.
5. Soons PA, Schellens JHM, Roosemalen MCM, Breimer DD. Analysis of nifedipine and its pyridine metabolite dehydronifedipine in blood and plasma: review and improved high-performance liquid chromatographic methodology. *J Pharm Biomed Anal* 9 (1991) 475-484.
6. Waller DG, Renwick AG, Gruchy BS, George CF. The first pass metabolism of nifedipine in man. *Br J Clin Pharmacol* 18 (1984) 951-954.
7. Pietta P, Rava A, Biondi P. High-performance liquid chromatography of nifedipine, its metabolites and photochemical degradation products. *J Chromatogr* 210 (1981) 516-521.
8. Kowalczyk D et al. Determination of nifedipine in serum of women in preterm labor by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *J AOAC Int* 89 (2006) 71-77.
9. Grundy JS, Kherani R, Foster RT. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for nifedipine in human plasma utilizing ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 654 (1994) 146-151.
10. Zedelovska D, et al. Development of an HPLC method for the determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction. *J Chromatogr B* 839 (2006) 85-88.
11. Yritia M, Parra P, Iglesias E, Barbanj JM. Quantification of nifedipine in human plasma by on-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 870 (2000) 115-119.

Correspondentie:
Y.N. Wempe – van Tilborg
Amphia Ziekenhuis
Molengracht 21
4818 CK Breda
Tel: +31765955412
E-mail: yvanwempe@amphia.nl

