



De bepaling van anti-epileptica met behulp van solid phase extractie.

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

Inleiding

In ons laboratorium worden diverse anti-epileptica bepaald. Fenytoïne, fenobarbital, carbamazepine en valproïnezuur worden bepaald met de FLx, terwijl lamotrigine, mono-OH-carbamazepine (de werkzame metabooliet van oxcarbazepine) en 10,11-carbamazepine-epoxide (de metabooliet van carbamazepine) worden bepaald middels vloeistof-vloeistof extractie in een reversed phase HPLC systeem. De vloeistof-vloeistof-extractie wordt uitgevoerd met dichloormethaan in basisch milieu met behulp van een boraat-buffer met pH = 10. Aan de extractie met dichloormethaan kleven enkele nadelen. Op de eerste plaats is dichloormethaan een onaangenaam riekende stof met schadelijke eigenschappen. Daarnaast is de vloeistof zwaarder dan water, wat verwijderen van de laag dichloormethaan tijdens de extractie bemoeilijkt. Om deze twee problemen te omzeilen is gezocht naar een andere methode. Hierbij kwam SPE (Solid Phase Extractie) al snel om de hoek kijken. Wij hebben gekozen voor de 2-D methode met Oasis extractie-kolom-

metjes van Waters. Het opzetten van de methode en de uiteindelijke resultaten en conclusies zijn hieronder beschreven.

Materialen en methode

Monstervoorbewerking

De monstervoorbewerking wordt uitgevoerd met een extractie manifold. (Waters, Etten-leur, part. No. WAT207606). 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.), 5µm (Waters, Etten-Leur, part no. WAT 46970) in combinatie met een voorkolom Symmetry C8 Sentry Guard (20 x 3,9 mm i.d.), 5µm (Waters, Etten-Leur, part. No. WAT054250). De loopvloeistof bestaat uit een mengsel van een 0,1 M KH_2PO_4 buffer op pH 4 gebracht met fosforzuur 17% en acetonitril in een verhouding 70:30. De flow bedraagt 1,3 ml/min. Detectie vindt plaats bij 215 nm. Het injectievolume is 40 µl.

Reagentia

- 2% NH_4OH -oplossing: 4000 mg NaCl, 100 mg KCl, 100 mg KH_2PO_4 ,

575 mg Na_2HPO_4 oplossen in 1000 ml demi water en op pH=7 brengen met fosforzuur 85%.

- 2% NH_4OH -oplossing: voeg 20 ml geconcentreerde ammonia toe aan 980 ml aqua demi.
- 2% CH_3COOH -oplossing: voeg 20 ml geconcentreerd azijnzuur toe aan 980 ml aqua demi.

Het vooronderzoek

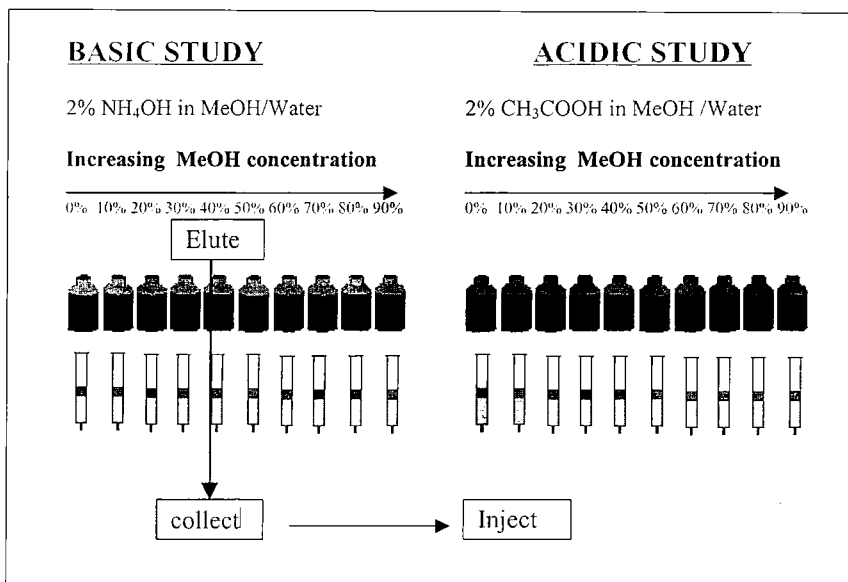
De methode-ontwikkeling vindt plaats volgens de zogenaamde 2-D methode. De theoretische achtergronden van deze methode zijn in Extract, jaargang 14, nummer 4, december 2003 uitgebreid behandeld door Rick Langen en Marjolein van Essenbergh van het laboratorium van de Ziekenhuis apotheek Midden-Brabant (1). Omdat onze aanpak op diverse punten wezenlijk verschilt van hun aanpak is onze wijze van aanpak hieronder uitvoerig beschreven. Met de methode ontwikkeling volgens het 2-D model is het mogelijk om in korte tijd informatie te krijgen over de te gebruiken was- en elutiestappen, resulterend in extracten vrij van storende componenten afkomstig van het plasma waarin zich de componenten bevinden. Met andere woorden: tijdens het wasen is het de bedoeling dat interfererende verontreinigingen van het SPE materiaal worden verwijderd, maar niet de te bepalen component. Tijdens de elutie moet het omgekeerde proces plaats-

vinden. Nu is het de bedoeling dat de te bepalen component kwantitatief van het kolom materiaal wordt verwijderd, eventuele nog aanwezige storende componenten moeten blijven zitten.

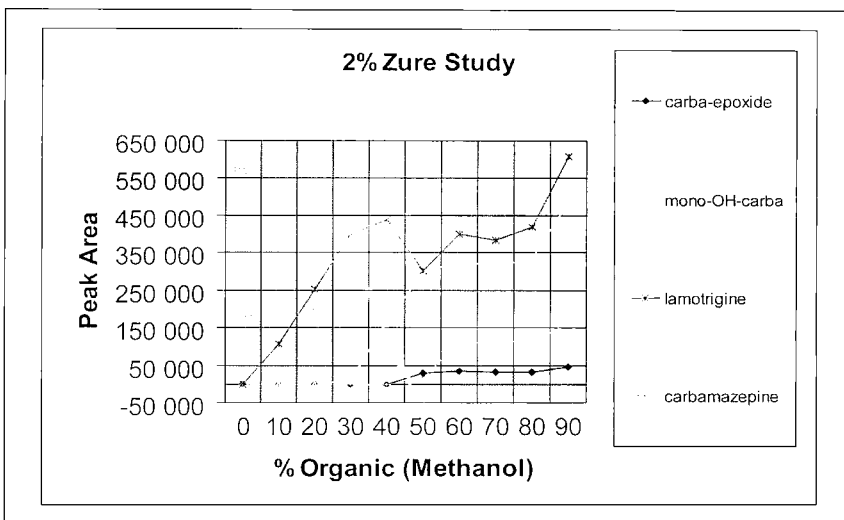
Op basis van deze feiten heeft de firma Waters een was- en elutie procedure ontwikkeld die het mogelijk maakt door variatie van de concentratie organische fase en de pH tot een optimale SPE methode te komen (2). In ons geval werd hiertoe een oplossing gemaakt van lamotrigine (5 mg/l), mono-OH-carbamazepine (20 mg/l), carbamazepine (5 mg/l) en 10,11 carbamazepine-epoxide (1 mg/l) in saline-oplossing. Na conditionering van de cartridges met 1 ml methanol en 1 ml water werden de cartridges geladen met 1 ml van de saline-oplossing. Tien cartridges worden vervolgens geëluëerd met 1 ml van verschillende oplossingen die 0 tot 90% methanol bevatten in 2% azijnzuur, oplopend in stappen van 10% methanol (zure studie). De andere 10 cartridges worden geëluëerd met 1 ml van verschillende oplossingen die 0 tot 90% methanol bevatten in 2% ammonia, oplopend in stappen van 10% methanol (basische studie). Zie figuur 1.

Het eluaat van iedere cartridge is vervolgens geanalyseerd met het bestaande HPLC systeem. De oppervlakte onder de piek voor iedere component is hierna uitgezet tegen het percentage methanol voor zowel de zure als de basische studie. Het oppervlak onder de piek is uiteraard "nul" wanneer de component zich nog op de cartridge bevindt. Hieronder zijn voor betreffende componenten zowel de zure als de basische studie weergegeven.

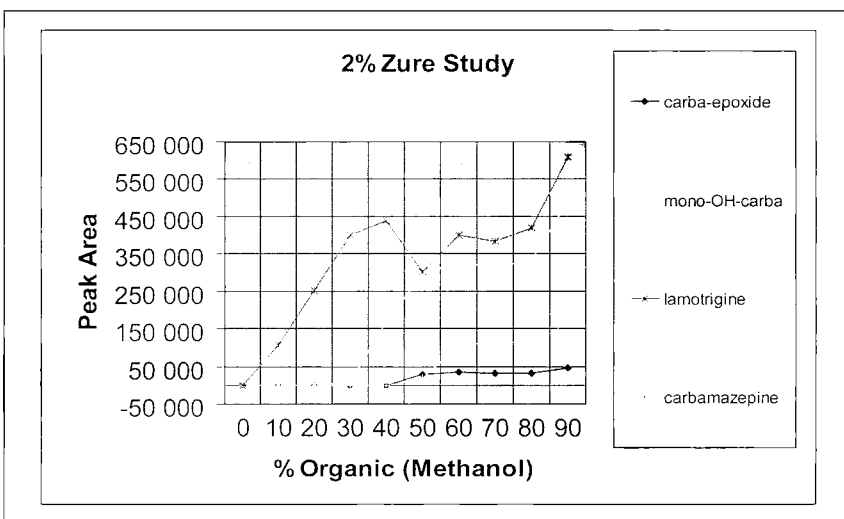
Met behulp van deze twee studies kunnen we een 2-D methode ontwikkelen die in staat is matrix interferenties te reduceren. Uit de basische studie kunnen we bijvoorbeeld afleiden, dat na wassen met 30% methanol in 2% ammonia



Figuur 1. 2Dmethode



Figuur 2. acidstudy



Figuur 3. basicstudy

de componenten zich nog steeds op het kolommateriaal bevinden. Dit is wasstap 1. Uit de zure studie volgt een wasstap met azijnzuur 2%. Ook bij deze samenstelling blijven de componenten op het kolommateriaal zitten. Dit is wasstap 2. Om de componenten van het kolommateriaal te spoelen wordt gekozen voor een elutie in zuur milieu. In dit geval is gekozen voor 90% methanol in 2% azijnzuur. Nadeel van bovenstaande methode-ontwikkeling is dat de procedure wordt toegepast op componenten gespiked in de saline-oplossing. Middels een validatie van de methode zal worden nagegaan of de gekozen was en elutie procedure ook toepasbaar is voor de componenten gespiked in plasma.

N.B. Voor de elutie wordt 1 ml van een oplossing van 90% methanol in 2% azijnzuur gebruikt. Het percentage water in deze oplossing maakt droogdampen echter zeer tijdrovend. Daarom werd tijdens de pre-validatie uitgetest of de elutie-vloeistof vervangen kon worden door 100% methanol. Het is de bedoeling om bij eventuele volgende studies 100% methanol als elutie-stap mee te nemen.

Was en elutieprofiel

1 ml methanol
1 ml aqua demi
0,2 ml monster
1 ml 30% methanol in 2% ammonia: wasstap 1
1 ml azijnzuur 2%: wasstap 2
1 ml methanol: elutie

Na droogdampen van de methanol wordt het residu opgenomen in 100 µl loopvloeistof. Hiervan wordt 40 µl geïnjecteerd.

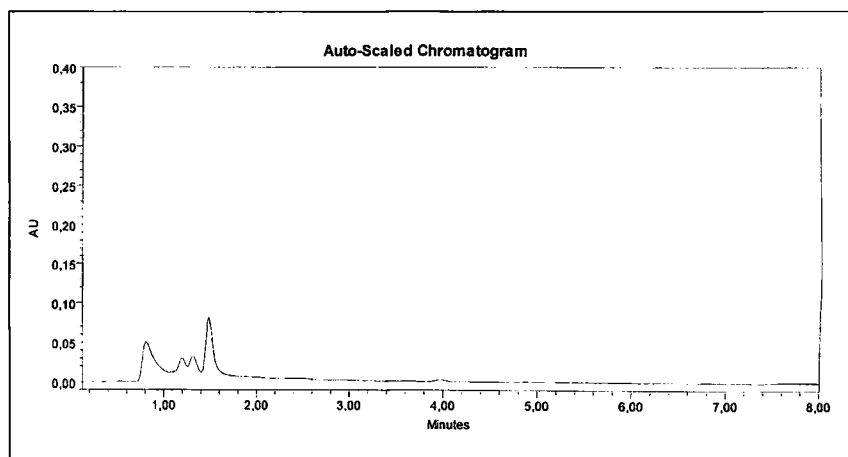
Vorbereiding monster

Aan 1 ml plasma wordt 20 µl fosforzuur 85% (verstoring geneesmiddel-eiwit interactie) en 20 µl doxepine HCl (1 mg/ml in water) toegevoegd. Doxepine is de interne standaard. Tijdens de extractie wordt 0,2 ml plasma op het kolommateriaal gebracht.

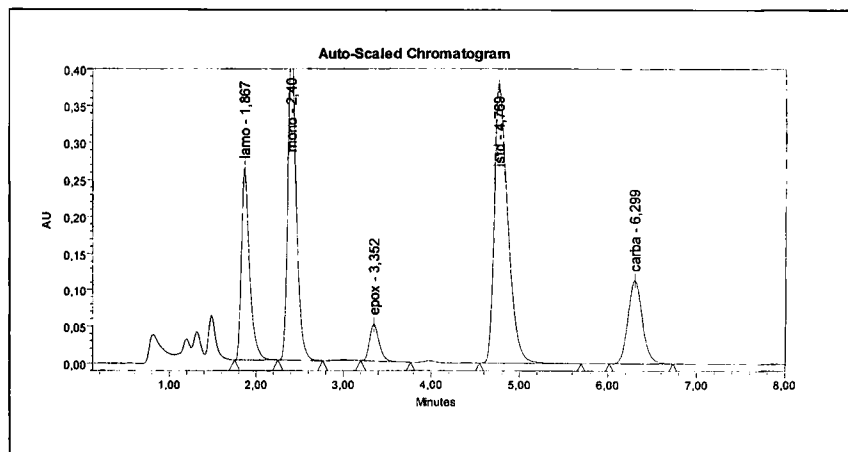
Pre-validatie

De pre-validatie bestaat uit een aantal experimenten, die worden uitgevoerd om te evalueren of verdere analyse nog zin heeft. In ons laboratorium wordt hiertoe de specificiteit en selectiviteit bekeken en het calibratiemodel getoetst. Om de specificiteit te bepalen worden 6 onafhankelijke blanco plasma matrices opgewerkt volgens de ontwikkelde methode. Visueel wordt beoordeeld of deze matrices vrij van de te bepalen component een storende respons geven. Hieronder is een chromatogram te zien van blanco plasma zonder componenten (figuur 4) en een chromatogram van blanco plasma gespiked met lamotrigine (5 mg/l), mono-OH-carbamazepine (20 mg/l), 10,11-carbamazepine-epoxide (2 mg/l) en carbamazepine (5 mg/l); (figuur 5) Doxepine is de interne standaard.

Duidelijk is te zien dat het blanco plasma geen pieken laat zien op de retentietijden waar de te bepalen componenten elueren. De selectiviteit wordt bepaald door een representatief monster te chromatograferen, waarin zich naast de te onderzoeken componenten ook eventuele co-medicatie bevindt. In dit geval is alleen gekeken naar andere anti-epileptica. Fenytoïne, fenobarbital, clobazam en desmethylclobazam vertoonden geen storing in de bepaling. Tijdens de pre-validatie werd van iedere component een ijklijn gemaakt van zes punten gelijk verdeeld over het gekozen concentratiebereik. Ieder punt werd in triplo geanalyseerd. Alle lijnen voldeden aan de eis dat de afwijking van de teruggerekende X-waarde bij het laagste ijkpunt 20% mag bedragen en bij de resterende punten 15%.



Figuur 4.



Figuur 5.

De validatie

Voor het bepalen van de juistheid, de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid werden voor iedere component 4 validatiemonsters bereid, gelijk verdeelt over het te valideren concentratiebereik.

X1 = het concentratieniveau dat gelijk is aan dat van het laagste ijkpunt

X2 = dit is het lage niveau, overeenkomend met 3-5 maal de waarde van X1

X3 = deze komt overeen met de concentratie in het middelste gebied van de ijklijn.

X4 = dit is het hoge niveau overeenkomend met ongeveer 80% van het hoogste ijkpunt.

Voor het bepalen van de validatieparameters wordt ieder niveau

gedurende 5 dagen in triplo geanalyseerd. Als eis voor de juistheid geldt dat de afwijking t.o.v. de theoretische waarde niet meer mag afwijken dan 15% voor de niveaus X2, X3 en X4 en niet meer dan 20% voor X1. Als eis voor de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid geldt dat de variatiecoëfficiënt kleiner moet zijn dan 15% voor de niveaus X2, X3 en X4 en kleiner dan 20% voor niveau X1.

Tabel 1

Lamotrigine mg/l	Juistheid %	Herhaalbaarheid VC %	Reproduceerbaarheid VC %
0,5	103,1	2,44	14,01
2,5	96,2	2,68	5,77
8,0	96,4	2,13	1,23
25,0	94,8	0,75	3,92
Recovery	92%		
Bepalingsgrens	0,5 - 30 mg/l		

Tabel 2

Mono-OH-carba mg/l	Juistheid %	Herhaalbaarheid VC %	Reproduceerbaarheid VC %
1,0	99,1	2,67	8,71
5,0	99,9	1,86	4,53
20,0	99,8	1,26	2,50
50,0	97,7	0,70	3,63
Recovery	94%		
Bepalingsgrens	1,0 - 60 mg/l		

Tabel 3

Carbamazepine mg/l	Juistheid %	Herhaalbaarheid VC %	Reproduceerbaarheid VC %
0,5	97,6	5,98	9,40
2,5	96,5	0,99	2,99
6,0	96,8	0,63	2,18
20,0	96,6	0,70	1,95
Recovery	89%		
Bepalingsgrens	0,5 - 30 mg/l		

Tabel 4

10, 11 carba-epox mg/l	Juistheid %	Herhaalbaarheid VC %	Reproduceerbaarheid VC %
0,08	93,7	4,82	15,66
0,40	96,1	1,38	10,80
1,60	94,7	0,65	3,63
3,60	93,9	1,86	4,00
Recovery	69%		
Bepalingsgrens	0,08 - 5 mg/l		

De recovery

De recovery wordt bepaald voor de validatiemonsters X2 en X3 door deze gedurende drie dagen in triplo te analyseren en te vergelijken met een oplossing in eluens overeenkomend met 100% recovery.

Aan de recovery wordt geen eis gesteld, maar deze moet zo hoog mogelijk zijn.

Resultaten validatie

In de onderstaande tabellen zijn de validatie resultaten voor lamotrigine, mono-OH-carbamazepine, 10,11-carbamazepine-epoxide en carbamazepine weergegeven.

Conclusie

Methode-ontwikkeling met behulp van de 2-D methode is snel en makkelijk uitvoerbaar. Het geeft binnen korte tijd waardevolle informatie over de mogelijke wasstappen en de te gebruiken elutiestap. Het gebruik van SPE in de analyse van de onderzochte componenten heeft als voordeel ten opzichte van de vloeistof-vloeistof-extractie dat er niet meer gebruik gemaakt hoeft te worden van het toxische dichloormethaan. De methode is sneller en alle validatieparameters voldoen aan de door ons gestelde eisen. De routine-matige bepaling van lamotrigine en

mono-OH-carbamazepine zijn inmiddels in ons laboratorium in gebruik genomen. Momenteel zijn we bezig met de ontwikkeling van een analysemethode voor diverse psychofarmaca met behulp van SPE. Hierover zal ik jullie op de hoogte houden.

Literatuur

1. R. Langen en M. van Essenberg: SPE monstervoorbewerking van antivirale middelen. Indinavir als modelstof. *Extract*, 2003: 14(4).
2. *Chromatographic Columns and Supplies catalog*: Waters Etten-Leur