



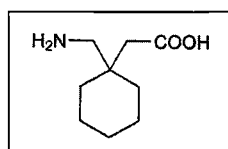
SPE monstervoorbewerking van Gabapentine

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

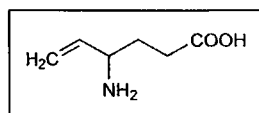
Inleiding

In apotheek laboratoria is het aan elkaar uitbesteden van onderzoek heel gebruikelijk, doorgaans uit oogpunt van efficiëntie. Op deze wijze hoeft niet elk laboratorium alle specifieke deskundigheid zelf te bezitten. Daarnaast wordt voorkomen dat elk laboratorium steeds opnieuw het wiel moet uitvinden. Zo ook in ons laboratorium. Diverse psychofarmaca worden ter bepaling uitbesteed aan de stichting ZALV in Venray. Het gaat voornamelijk om geneesmiddelen met een zeer laag normaalgebied zoals: haloperidol, flufenazine en flupentixol. Omdat deze aanvragen in dermate lage frequentie voorkomen, loont het zich niet de moeite een nieuwe methode, geschikt voor ons laboratorium, voor deze geneesmiddelen te ontwikkelen. En dan heb ik het nog niet eens over de uitgebreide validatie die hier op volgt. Hetzelfde geldt voor de stichting ZALV, wat resulteert in een veelvuldige uitwisseling van bepalingen. Daarnaast is een bijkomend voordeel dat Wilbert Wijnhoven, hoofd-analist in Venray, dertien jaar in ons laboratorium werkzaam is geweest. Je weet dus met wie je praat en hoe hij denkt over kwaliteitseisen in een apotheek laboratorium. Enige jaren geleden alweer werden wij geconfronteerd met aanvragen voor het anti-epilepticum gabapentine. Zelf hadden we hier geen analyse voor op de plank liggen. Uit een kort telefoontje met Wilbert bleek dat zij nog niet lang geleden een methode hiervoor hadden ontwikkeld op de GLC met solid phase extractie. Het aantal aanvragen bij ons was laag, dus werd er besloten de bepaling uit te besteden. Enkele weken geleden

kreeg ik een brief van de stichting ZALV met daarin het volgende: door het lage aantal aanvragen voor gabapentine zien wij ons genoodzaakt deze bepaling uit te besteden aan een extern laboratorium, aanvragen zullen derhalve hieraan worden doorgestuurd. Even bellen met Wilbert dus. Na wat uitwisseling van informatie en met in het achterhoofd een stijgend aantal aanvragen bij ons, waren we het er al snel over eens dat in feite wij de methode zo konden overnemen. Immers, we waren in het bezit van het zelfde type kolom en houden ons al sinds geruime tijd bezig met solid phase extractie van geneesmiddelen uit bloed. Even later rolde de fax met het analysevoorschrift uit Venray binnen. In eerste instantie werd de methode nagewerkt. In principe werkte dit uitstekend, alleen over de keuze van de interne standaard (vigabatrine) was ik niet tevreden, te veel tailing. De twee structuurformules van beide stoffen zijn hieronder weergegeven. Het betreft twee componenten



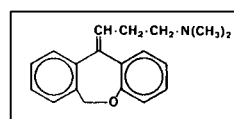
Gabapentine



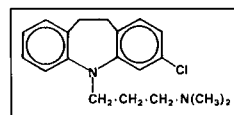
Vigabatrine

waarin zowel een zure (-COOH) als basische groep (-NH₂) aanwezig zijn. De firma Waters brengt twee soorten extractiekolommetjes op de markt, een speciaal ontworpen voor componenten met zure eigenschappen (MAX) en een speciaal ontworpen voor basische componenten (MCX). Wilbert had gekozen voor de variant MCX, een logische keuze.

De vergelijkbare structuurformule van gabapentine en vigabatrine deed mij in eerste instantie ook zoeken naar een component met zowel zure als basische eigenschappen. Uitgeprobeerd werden o.a. gamma-amino-boterzuur en 5-amino-levulaanzuur. Ook zij vertoonden tailing op de apolaire HP-1 kolom. 's Avonds thuis ging mij in een keer een licht branden (eureka riep ik uit, overigens zat ik niet in bad). Als je gebruik maakte van MCX kolommetjes moest het toch mogelijk zijn een interne standaard te kiezen met 100% basische eigenschappen, waarom zo moeilijk doen.



Doxepine



Clomipramine

De volgende dag doxepine en clomipramine inspuiten leverde het gewenste resultaat, geen tailing voor beide componenten. Ook tijdens de extractie kwamen deze componenten reproduceerbaar te voorschijn.

Nog een kleine aanpassing door toevoeging van een extra wasstap leverde een methode op die voor ons bruikbaar was. Weer een dag later heb ik Wilbert gebeld en de door ons aangebrachte wijzigingen met hem doorgesproken. Tegenwoordig worden de aanvragen vanuit Venray naar ons opgestuurd. Het is op deze manier mogelijk om snel een bruikbare methode op te zetten, maak gewoon gebruik van elkaars know how. Deze werkwijze of strategie, hoe je het ook wilt noemen, vonden we beiden betekenisvol genoeg om in Extract te plaatsen.

Gabapentine

Gabapentine (Neurontin®) is qua structuur verwant aan de neurotransmitter gamma-aminoboterzuur. Het heeft echter een ander werkingsmechanisme, dat nog niet is opgehelderd. Het grijpt niet aan op GABA-receptoren en wordt niet omgezet in een GABA-agonist. Het vermindert de neuronale gevoeligheid via binding aan calciumkanalen op centrale neuronen. Verder vermindert het de afgifte van verschillende neurotransmitters, zoals glutamaat, norepinefrine en substance-P. Gabapentine wordt toegevoegd aan andere anti-epileptica, in die gevallen waarin de patiënt onvoldoende reageert op andere anti-epileptica. Gabapentine wordt verder o.a. gebruikt voor de behandeling van neuropathische pijn en tijdens de manische fase bij een bipolaire stoornis. Het heeft geen interactie met de meeste andere anti-epileptica.

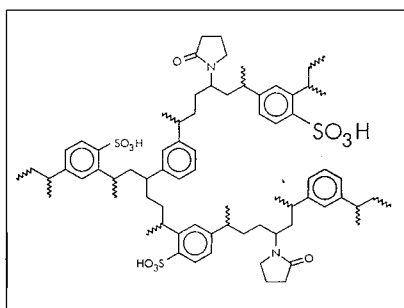
Therapeutische spiegels zijn 2-20 mg/l, maar dit is niet voorspellend voor de werkzaamheid. Bijwerkingen zijn slaperigheid, duizeligheid, misselijkheid en vele anderen. Meestal zijn deze van voorbijgaande aard. Overdoseringen verlopen meestal mild, met duizeligheid, dubbelzien, moeilijke spraak en sufheid.

Oasis MCX

Voor de bepaling van gabapentine wordt gebruik gemaakt van Oasis MCX extractie kolommen. MCX staat voor Mixed-mode-Cation-exchange en is een kolom speciaal ontwikkeld voor de extractie van componenten met basische eigenschappen. Het MCX kolommateriaal bezit zowel reversed phase als "kation exchange" eigenschappen. Aan het oppervlak van de fase bevinden zich sulfonzuur groepen die een hoge selectiviteit voor basische componenten bezitten. Na het opbrengen van het plasma bindt het geneesmiddel in eerste instantie aan het poly copolymeer (divinylbenzeen-co-N-vinylpyrrolidone). Hierna wordt de kolom gewassen met een oplos-

sing van 0,1 M zoutzuur. Hierdoor worden de basische componenten positief geladen en vindt binding plaats aan de negatief geladen sulfonzuur groepen. De basische 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 basische component achterblijft. Dit resulteert in zeer schone extracten. De binding tussen de basische component en het SPE materiaal kan worden verbroken door de kolom te wassen met een oplossing die 92% methanol en 8% ammonia 25% bevat. De ammonia zorgt ervoor dat de basische component weer neutraal wordt en in combinatie met de methanol van de kolom spoelt.

In onderstaande figuur staat de structuur van MCX weergegeven.



Materialen en methode

De monstervoorbewerking wordt uitgevoerd met een extractie Manifold. (Waters, Etten-leur, part. No. WAT 200606). De SPE kolommetjes die worden gebruikt zijn Waters oasis MCX 1cc (30mg) extractie cartridges (Waters, Etten-Leur, part. No. 186000252

GLC-systeem

Het GLC systeem bestaat uit een HP6890 Gas Chromatograaf met FID detectie.

Kolom: HP-1 (30 m x 0,53 mm i.d., $D_f = 2,65 \mu\text{m}$),

Temperatuur programma:

120°C/2 min. → 30 °C/mzin. → 275 °C/8 min.

Injectietemperatuur: 275 °

Detectietemperatuur: 275 °C/FID

Draaggas: Helium 5,0 ml/min

constant flow

Make up flow: 25,0 ml/min.

Injectie: Splitloos/1 µl injecteren

Grondstoffen

Methanol p.a. (VWR International)

Ammonia 25% p.a.

(VWR International)

Azijnzuur 100% (VWR International)

Fosforzuur 85% p.a.

(VWR International)

Aqua destillata (Baxter)

Doxepine HCl

Clomipramine HCl

Gabapentine

Reagentia

2% azijnzuur

Zoutzuur 0,1 M

50% methanol in 2% azijnzuur

Methanol/ammonia 92/8

Standaarden

Bereid een stamoplossing van gabapentine met concentratie 1,0 mg/ml in methanol.

Verdun 0,2 ml stamoplossing ad 1,0 ml methanol (oplossing A)

2 mg/l: 10 µl oplossing A

ad 1,0 ml blanco plasma

5 mg/l: 25 µl oplossing A

ad 1,0 ml blanco plasma

10 mg/l: 50 µl oplossing A

ad 1,0 ml blanco plasma

20 mg/l: 100 µl oplossing A

ad 1,0 ml blanco plasma

Interne standaard

Doxepine en clomipramine 1,0 mg/ml in methanol.

Doxepine wordt gebruikt tijdens de bepaling, clomipramine wordt als reserve meegenomen.

Uitvoering van de extractie

Neem 1,0 ml plasma van standaarden, controle of monster. Voeg hieraan toe 20 µl fosforzuur 85% en 20 µl interne standaard. Vortex en centrifugeer. Plaats vervolgens het aantal benodigde extractie kolommetjes op

de manifold. Volg hierna onderstaande stappen.

01. 1 ml methanol.
02. 1 ml water.
03. 0,9 ml plasma van standaard, monster of controle.
04. 1 ml 0,1 m zoutzuur. (was/lock stap)
05. 1 ml 50% methanol in 2% azijnzuur. (wasstap)
06. 1 ml methanol. (wasstap)
07. Plaats het aantal benodigde buisjes voor de elutie in de manifold.
08. 1 ml methanol – ammonia 25% 92-8. (elutie)
09. Damp droog onder een stroom van stikstof bij 40 °C.
10. Neem het residu op in 70 µl methanol en injecteer 1 µl.

Chromatogram

Chromatogram van een 10 mg/l standaard van gabapentine in blanco plasma. (Zie chromatogram onderin deze pagina.)

Gabapentine	7,08 minuten
Doxepine = istd	11,46 minuten
Clomipramine	13,98 minuten

Slotopmerking

Het blijkt door op deze manier te werk te gaan dat het mogelijk is om snel een nieuwe methode in het laboratorium te introduceren. Door gebruik te maken van kennis uit een ander laboratorium worden kostbare tijd en centen gespaard. De kleine aanpassingen in de bepaling die door ons zijn uitgevoerd hebben niet langer dan een dag geduurd. De bepaling zal zo spoedig mogelijk worden gevalideerd, de resultaten van de meegenomen controles

tijdens de bepaling en het lineaire verband dat telkens voor de kalibratiecurve wordt gevonden, geven ons echter voldoende vertrouwen om de bepaling van gabapentine in plasma in de routine op te nemen.

Tot slot wil ik Noël Hermans van de stichting ZALV bedanken, het meeste onderzoek wat heeft geleid tot de bepaling van gabapentine in plasma komt van zijn hand.

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

