



Methodieken

ONVERKLAARDE MIDAZOLAMCOMA'S MOGELIJK VERKLAARD.

Richard v. Rossen
Henk Trumpie
Apotheek Haagse Ziekenhuizen

Midazolam (Dormicum) is een benzodiazepine dat veel gebruikt wordt op de IC als sedativum. Het heeft bij de meeste patiënten een vrij korte werking (eliminatiehalfwaardetijd 3 uur).

Per jaar krijgen wij ca. 5 aanvragen voor een midazolam bloedspiegelbepaling. De aanleiding voor een midazolam-aanvraag is in de meeste gevallen het feit dat de patient lang na het staken van de midazolam-toediening nog steeds in coma is. De door ons gevonden concentraties midazolam en de werkzame metaboliet α -hydroxymidazolam waren echter nooit hoog genoeg om het coma te verklaren.

Onlangs verscheen in de Lancet (1995;346:145-7) een studie die gedaan werd bij patiënten met nierinsufficiëntie (creatinineklaring < 7 ml/min), waarbij een verlengde werking van midazolam werd waargenomen.

Midazolam wordt gemetaboliseerd tot α -hydroxymidazolam, wat vervolgens als α -hydroxymidazolam-glucuronide via de nieren wordt uitgescheiden. De onderzoekers hebben aangetoond dat door de nierinsufficiëntie cumulatieve van α -hydroxymidazolam-glucuronide in het bloed optreedt. Deze geconjugeerde metaboliet heeft weliswaar minder affiniteit tot de benzodiazepinereceptor dan midazolam en zijn metaboliet zelf, maar is wel farmacologisch actief. De spiegels kunnen een factor 10 of meer hoger zijn dan de midazolam- en α -hydroxymidazolam spiegels. Dit zou een plausibele verklaring kunnen zijn voor de onverklaarde coma's uit het verleden.

Enige weken nadat Dr.J.W.P.M. Overdiek (apotheker AHZ) via het Apotheek Informatie Bulletin de aangesloten ziekenhuizen op dit effect had gewezen kwam er op ons lab een midazolamaanvraag binnen, waarbij weer sprake was van een coma, nadat de midazolamtoediening was gestaakt. De concentraties midazolam en α -hydroxymidazolam waren resp. 0,42 mg/l

en 0,035 mg/l. Deze spiegels waren op zich hoog genoeg om het coma te verklaren. Een goede sederende werking wordt verkregen vanaf 0,15 mg/l midazolam (Lancet, 1995;346:145-7). Omdat het hier ging om een patient met een slechte nierfunctie (creatinineklaring 10 - 15 ml/min) was er voor ons toch aanleiding om te kijken naar de α -hydroxymidazolam-glucuronide spiegel en deze spiegel een aantal dagen te volgen.

Door α -hydroxymidazolamglucuronide te hydrolyseren is deze verbinding te bepalen als α -hydroxymidazolam. Midazolam en α -hydroxymidazolam worden bepaald m.b.v. HPLC-RP (STIP-chromatografie) na alkalische extractie, volgens onderstaand voorschrift.

Reagentia :

- STIP-buffer;
Gedest.Water 530 ml
Tri-ethylamine 146 μ l
Fosforzuur 85% 200 μ l
pH instellen op 3,3 met 10% KOH
- Boraatbuffer pH 9,3 ;
19,09 g borax/1000 ml water
pH instellen op 9,3
- Acetaatbuffer pH 4,9 ;
42,9 g Natriumacetaat.3aq
10,4 ml azijnzuur 100%
Water tot 500 ml
pH instellen op 4,9
- Extractiebuffer pH 9,6;
1 M Natriumwaterstofcarbonaat : NaOH
0,25 M = 2:1
pH instellen op 9,6

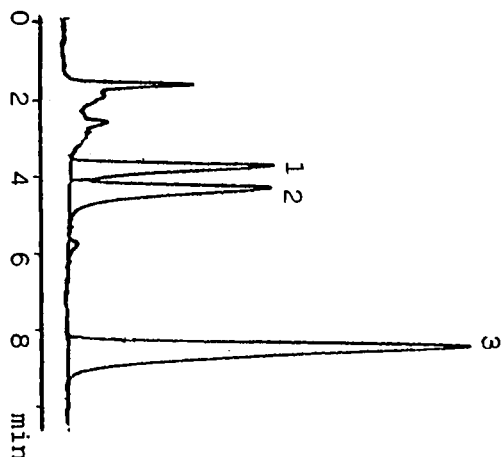
HPLC-omstandigheden :

Kolom : Lichrospher RP18 (Merck, art.nr.21568)
Eluens : Acetonitril 470 ml
STIP-buffer 530 ml
Flow : 0,6 ml/min
Detectie : UV, 254 nm
Inj.volume : 25 μ l

Retentietijden :

- Midazolam : 4.5 min.
- α -Hydroxymidazolam : 3.9 min.
- Diazepam : 8.6 min.

Onderstaand chromatogram is een chromatogram van een niet-gehydrolyseerd extract. De concentraties midazolam en α -hydroxymidazolam zijn resp. 0,275 mg/l en 0,232 mg/l.



- 1 = α -hydroxymidazolam
2 = midazolam
3 = diazepam

Uitvoering midazolam + α -hydroxymidazolam

Calibratiecurve :

- Midazolam : 0,1 - 0,5 mg/l serum
- α -Hydroxymidazolam : 0,1 - 0,5 mg/l serum

Voeg toe aan 0,5 ml serum 100 μ l interne standaardoplossing (2,5 mg/l diazepam), 0,5 ml boraatbuffer pH 9,3 en 6 ml dichloormethaan. Schud 10 minuten, centrifugeer 10 minuten en damp vervolgens de DCM-laag in bij 37 °C. Los het extract op in 100 μ l eluens en breng hiervan 25 μ l op de kolom.

Uitvoering α -hydroxymidazolamglucuronide

Calibratiecurve : α -hydroxymidazolam : 0,1 - 0,5 mg/l serum

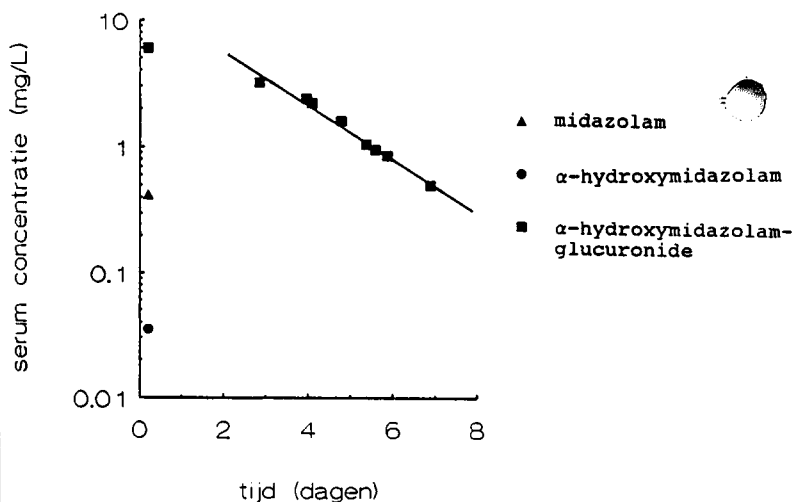
Voeg toe aan 0,5 ml serum 200 μ l acetatbuffer pH 4,9 en 50 μ l glucuronidase (IBF biotechnics) en zet het monster 18 uur bij 37 °C (bij hoge spiegels wordt van minder patient serum uitgegaan). Voeg vervolgens toe 100 μ l interne stan-

daard oplossing (2,5 mg/l diazepam), 0,5 ml extractiebuffer pH 9,6 en 6 ml dichloormethaan. Schud 10 minuten, centrifugeer 10 minuten en damp vervolgens de DCM-laag in bij 37 °C. Los het extract op in 100 μ l eluens en breng hiervan 25 μ l op de kolom.

De concentratie α -hydroxymidazolamglucuronide is het verschil tussen de concentratie α -hydroxymidazolam na hydrolyse en de concentratie α -hydroxymidazolam voor hydrolyse.

Resultaten.

De gevonden spiegels zijn weergegeven in onderstaand figuur.



Het eerste monster bevatte naast 0,42 mg/l midazolam en 0,035 mg/l α -hydroxymidazolam ook 6,0 mg/l α -hydroxymidazolamglucuronide. Na drie dagen waren midazolam en α -hydroxymidazolam niet meer aantoonbaar ($<0,01$ mg/l). De concentratie α -hydroxymidazolamglucuronide was op dat moment nog 3,2 mg/l. Zelfs na zeven dagen was nog 0,5 mg/l α -hydroxymidazolamglucuronide aantoonbaar. Dit komt neer op een halfwaardetijd van 34 uur.

Discussie.

Overeenkomend met de literatuur worden hoge concentraties α -hydroxymidazolamglucuronide gevonden. Het is heel goed mogelijk dat deze concentraties een verlengd coma veroorzaken. De analyse van midazolam en α -hydroxymi-

dazolam loopt goed. Omdat er gebruik wordt gemaakt van de STIP chromatografie zou co-medicatie een probleem kunnen opleveren.

De analyse van α -hydroxymidazolamglucuronide is acceptabel. Door de hydrolyse ontstaan enkele stoorpieken en een breed front. Een ander nadeel is de lange hydrolysetijd, waardoor de analyse minimaal 24 uur duurt.

Ondanks dat de analyse nog niet optimaal is, zijn de gevonden concentraties α -hydroxymidazolamglucuronide dermate hoog dat het ons nuttig leek om op dit moment al verslag te doen.

Het verkorten van de hydrolysetijd en het zoeken naar een selectieve HPLC methode heeft nu onze aandacht. In het volgende nummer van Extract hopen wij hiervan verslag te doen.

Suggesties zijn uiteraard van harte welkom.