

methodieken

VERBETERDE ANALYSE VAN MIDAZOLAM, α -HYDROXYMIDAZOLAM EN α -HYDROXYMIDAZOLAM-GLUCURONIDE.

Richard v. Rossen
Henk Trumpie
Apotheek Haagse Ziekenhuizen

In extract nr. 1 van 1996 (pagina 9-11)

hebben wij de analyse van α -hydroxymidazolamglucuronide in serum beschreven.

Deze analyse kan noodzakelijk zijn bij patiënten met nierinsufficiëntie die behandeld worden met midazolam. In het artikel wordt aangegeven dat deze analyse nog niet optimaal is.

Ten eerste is de gebruikte HPLC methode (STIP-chromatografie) niet erg selectief. Hierdoor kan co-medicatie een probleem opleveren.

Tevens ontstaan door hydrolyse enkele extra pieken die de α -hydroxymidazolam deels storen.

Ten tweede bedraagt de analysetijd minimaal 24 uur, omdat er 18 uur wordt gehydrolyseerd.

De afgelopen maanden zijn wij er in geslaagd om zowel de HPLC methode te verbeteren, als de analysetijd te verkorten.

Verbetering HPLC methode

We zijn uitgegaan van onze bestaande HPLC-methode voor de analyse van benzodiazepinen.

De HPLC-condities zijn als volgt:

kolom:
Zorbax C8, 15 cm x 4,6mm
eluens:
Methanol: buffer pH 5,9 57:43
buffer pH 5,9 :
1,19 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 8,17 g KH_2PO_4
in 1 l H_2O , op pH brengen met NaOH of H_3PO_4
flow: 1,5 ml/min.

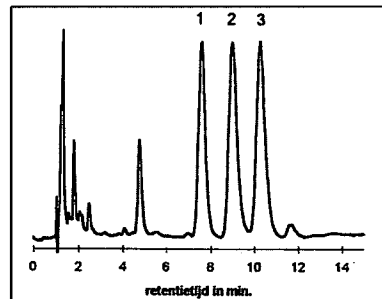
Onder deze condities komt midazolam laat van de kolom (rt = 16,6 min.). De retentietijd van midazolam is sterk afhankelijk van de pH van het eluens. Door de pH van het eluens te verlagen komt midazolam sneller van de kolom. Dit in tegenstelling tot α -hydroxymidazolam en de interne standaard diazepam. Zie tabel 1.

tabel 1

pH buffer	rrt α -hydroxymidazolam	rrt midazolam
5,9	0,80	1,64
4,8	0,80	1,52
4,0	0,76	1,03
3,8	0,73	0,82
3,7	0,72	0,80

Invloed van de pH van de buffer in het eluens op de rrt van α -hydroxymidazolam en midazolam t.o.v. diazepam.

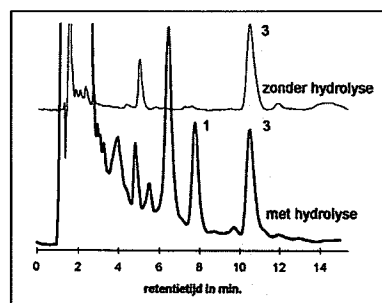
Er is voor buffer pH 3,8 gekozen. Midazolam, α -hydroxymidazolam en diazepam zijn hierbij basislijngescheiden. Ook wordt α -hydroxymidazolam niet meer gestoord door extra pieken die door de hydrolyse ontstaan. Zie chromatogram 1 en 2.



chromatogram 1

Chromatogram van een niet gehydrolyseerde serum standaard.

1 = α -hydroxymidazolam, 0,31 mg/l serum.
2 = midazolam, 0,37 mg/l serum.
3 = diazepam (interne standaard).



chromatogram 2

Samengesteld chromatogram van patiënt, zowel gehydrolyseerd als niet gehydrolyseerd serum.

1 = α -hydroxymidazolam na hydrolyse, 0,30 mg/l serum.
3 = diazepam (interne standaard).

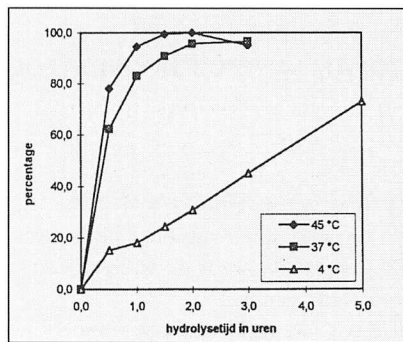
opmerkingen

- Door bij 230 nm i.p.v. 254 nm te meten wordt een factor 2 aan gevoeligheid gewonnen.
- De bepaling wordt gestoord door diazepam en zijn metaboliet nordazepam, aangezien nordazepam en α -hydroxymidazolam samen vallen. In deze situatie wordt voor buffer pH 5,9 in het eluens gekozen. Bij deze pH zijn deze stoffen wel gescheiden. Bij co-medicatie diazepam wordt camazepam als interne standaard gebruikt.

Verkorten analysetijd

De oorspronkelijke hydrolyse neemt veel tijd in beslag, namelijk 18 uur. De meeste tijdswinst kan worden gemaakt door deze stap te verkorten. De hydrolyse wordt op de volgende wijze uitgevoerd: 0,5 ml serum (0,29 mg/l α -hydroxymidazolamglucuronide) + 0,2 ml acetaatbuffer pH 4,9 + 50 μ l glucuronidase. Vervolgens wordt de invloed van de temperatuur op de hydrolysetijd van α -hydroxymidazolamglucuronide bekeken. De hydrolyse gedurende 18 uur bij 37 °C wordt als 100% waarde genomen. De resultaten staan vermeld in figuur 1.

Omdat glucuronidase extra pieken in het chromatogram veroorzaakt is bekeken of de hoeveelheid glucuronidase verminderd kan worden. Twee monsters α -hydroxymidazolamglucuronide zijn met verschillende hoeveelheden glucuronidase gehydrolyseerd (1 uur, 45 °C). De hydrolyse gedurende 18 uur bij 37 °C wordt als 100% waarde genomen. De resultaten staan vermeld in figuur 2.



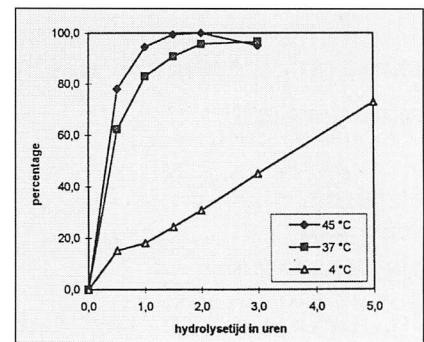
figuur 1

Invloed van de temperatuur op de hydrolyse van α -hydroxymidazolamglucuronide.

N.a.v. deze resultaten is gekozen voor 1 uur hydrolyse bij 45 °C. Dit betekent een tijdswinst van 17 uur t.o.v. de oorspronkelijke hydrolyse.

opmerking

De concentratie α -hydroxymidazolamglucuronide is het concentratieverschil van α -hydroxymidazolam voor en na hydrolyse.



figuur 2

Invloed hoeveelheid glucuronidase op de hydrolyse van α -hydroxymidazolamglucuronide.

N.a.v. deze resultaten is besloten om de hoeveelheid glucuronidase te handhaven op 50 μ l.

Bij de berekening wordt gebruik gemaakt van de volgende formule:

$$[\alpha\text{-OH-MG}] = d[\alpha\text{-OH-M}] \times \frac{M_{\alpha\text{-OH-MG}}}{M_{\alpha\text{-OH-M}}}$$

waarin:

$[\alpha\text{-OH-MG}]$ = concentratie α -hydroxymidazolamglucuronide

$d[\alpha\text{-OH-M}]$ = concentratieverschil van α -hydroxymidazolam voor en na hydrolyse

$M_{\alpha\text{-OH-MG}}$ = molekulgewicht van α -hydroxymidazolamglucuronide = 517,9

$M_{\alpha\text{-OH-M}}$ = molekulgewicht van α -hydroxymidazolam = 341,8

Conclusie en discussie

De HPLC-methode is duidelijk verbeterd. De methode is selectief en de extra pieken na hydrolyse storen niet meer.

De analysetijd is teruggebracht van 24 uur naar 6 uur. Hierdoor is het mogelijk om op dezelfde dag van de aanvraag een uitslag door te geven. Na publicatie van ons eerste artikel

is gebleken dat onder IC artsen veel behoefte is aan de bepaling van α -hydroxymidazolamglucuronide. In de maand mei hebben we 3 patiënten enkele weken gevolgd. Voor de behandeling is het soms gewenst om op dezelfde dag van de aanvraag een uitslag te geven om onverklaarbare coma's te verklaren.

Dit is niet altijd te realiseren.

Onze volgende stap is de bruikbaarheid van de benzodiazepinen analyse in serum m.b.v. de FLx te bekijken.

In het volgende nummer van Extract hopen wij hiervan verslag te doen.