

Semplice e rapido dosaggio della lamotrigina in associazione con altri farmaci antiepilettici nel plasma mediante hplc

Claudio Burrini

Istituto Ricerche Cliniche Prof. Manfredo Fanfani - Firenze

ABSTRACT

Simple and rapid determination of lamotrigine and associated antiepileptic drugs in plasma by high-performance liquid chromatography

This paper presents an HPLC method for the simultaneous determination of lamotrigine and other antiepileptic drugs (AED) in plasma, with a single preparative procedure and without instrument parameter variations. Plasma samples and a certified standard in serum matrix for lamotrigine, are treated with the reagents of a commercial kit for determination of AED, and with the calibration standard of the kit (primidone, ethosuximide, phenobarbital, carbamazepine, phenytoin e 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine (DHC)). The amount of lamotrigine and of associated AED are calculated by submitting the acquired chromatographic runs to double processing, using the calibrations obtained from the two certified standards.

RIASSUNTO

Viene qui presentato un metodo per la determinazione simultanea nel plasma della lamotrigina e di altri farmaci antiepilettici (AED) somministrati in associazione tramite tecnica HPLC, con unica procedura preparativa e senza variazioni delle condizioni strumentali. I campioni di plasma ed uno standard certificato in matrice sierica per lamotrigina, sono trattati con i reattivi contenuti all'interno di un kit commerciale per il dosaggio degli AED, insieme allo standard di calibrazione del kit (primidone, etosuccimide, fenobarbital, carbamazepina, fenitoina e 10,11-diidro-10-idrossicarbamazepina (DHC)). Le concentrazioni della lamotrigina e degli AED associati sono ottenute sottoponendo i tracciati cromatografici acquisiti ad una doppia elaborazione, utilizzando le calibrazioni ottenute dai due standard certificati.

INTRODUZIONE

Nel nostro laboratorio eseguiamo da tempo il dosaggio dei farmaci antiepilettici (AED) in HPLC utilizzando un kit commercializzato dalla ditta Microline.

Questo ci permette di dosare in una unica corsa cromatografica un ampio pannello di farmaci (etosuccimide, primidone, carbamazepina, fenitoina, fenobarbital), di visualizzare e quantificare alcuni metaboliti (carbamazepina 10,11-epossido, 10,11-diidrossicarbamazepina, desmetilmetsuccimide, fenilmetilmalonammide (PEMA) e di poter quantificare uno dei farmaci antiepilettici di più recente utilizzo terapeutico come la oxcarbazepina ed in particolare il suo metabolita attivo la 10,11-diidro-10-idrossicarbamazepina(DHC) (1-4).

Il metodo prevede una preparazione del campione molto rapida: diluizione di 100 μ L di plasma in 300 μ L di una soluzione contenente lo standard interno, la quale al tempo stesso agisce anche da deproteinizzante, una rapida ultracentrifugazione a 10000 rpm, ed una successiva diluizione di 100 μ L del sovrantante in 200 μ L di soluzione diluente direttamente nella vials di campionamento dello strumento.

La separazione cromatografica richiede circa 20 min (fig1-A) e permette di eluire e quantificare correttamente tutti gli analiti sopra menzionati.

La rapidità della preparazione, la minima manualità richiesta, la possibilità di dosare con un'unica preparazione più farmaci all'interno dello stesso campione (situazione che incide, nel nostro laboratorio, per circa il 10 % del totale delle richieste di AED) e l'utilizzo di un sistema HPLC munito di autocampionatore, rendono questa tecnica molto efficiente e vantaggiosa dal punto di vista diagnostico ed economico.

Un altro farmaco di nuova generazione che ha una buona incidenza di richieste presso la nostra struttura è la lamotrigina(4-9). Il dosaggio di questo ci viene quasi sempre richiesto in associazione con quello di altri AED (spesso carbamazepina e fenobarbital, ma, in casi sporadici, anche con primidone, fenitoina e oxcarbazepina).

In questo lavoro abbiamo valutato la possibilità di poter determinare questo farmaco utilizzando i componenti del kit FARMACI AED (Microline) ed uno standard di calibrazione in matrice sierica contenente lamotrigina.

Lo scopo era quello di ottenere un tracciato cromatografico privo di coeluzioni con altri farmaci e loro metaboliti, che permettesse non solo una corretta determinazione della lamotrigina, ma, in caso di richiesta associata di altri AED, anche la loro determinazione attraverso una semplice rielaborazione del cromatogramma già acquisito con la calibrazione ottenuta dallo standard contenuto nel kit.

MATERIALI E METODI

Kit diagnostico e colonna cromatografica per il dosaggio dei Farmaci antiepilettici (Microline, Badia a Settimo-FI). Standard di calibrazione in matrice siero liofilizzato per sultiam e lamotrigina della Recipe. La lamotrigina utilizzata per la preparazione della soluzione madre da utilizzare nelle prove di addizione, come per la preparazione di pool addizionati per la valutazione della ripetibilità, è stata ottenuta dalla SIGMA-ALDRICH (Milano).

In vials munite di tappo vengono aggiunti 100 µL degli standard di calibrazione e dei campioni. Questi sono poi trattati con 300 µL della soluzione contenente lo standard interno agitati sul vortex per 30 sec e poi centrifugati 15 min a 10000 rpm. 100 µL dei sovrantanti sono poi diluiti, direttamente nelle vials dell'autocampionatore, con 200 µL di soluzione diluente. Volume di iniezione 10 µL.

HPLC Waters Alliance 2690, detector Waters UV 2487, programma di gestione Millennium³²: flusso 0,6 mL/min, T colonna 32 °C; λ 205 nm.

I tracciati cromatografici acquisiti contenenti solo lamotrigina sono elaborati operando sulla calibrazione ottenuta dall'iniezione dello standard certificato per la lamotrigina, quelli contenenti anche altri AED sono poi riprocessati utilizzando la calibrazione ottenuta dalla iniezione dello standard di calibrazione contenuto nel kit diagnostico per il dosaggio dei farmaci antiepilettici. Il programma di gestione dati consente di archiviare, quindi di rintracciare nel tempo, ambedue le integrazioni.

RISULTATI

La ripetibilità (precisione dentro la serie) e la precisione intermedia (tra le serie) è stata valutata su due diversi livelli ottenuti per addizione di lamotrigina ad un pool di plasma.

Dentro la serie (n 6): media 4,38 µg/mL, CV(%) 0,91; media 8,07 µg/mL, CV(%) 2,97.

Tra le serie(n 6): media 4,37 µg/mL, CV(%) 4,11; media 8,38 µg/mL, CV(%) 3,70.

Il limite di rilevabilità è di 0,1 µg/mL. Questo è stato valutato strumentalmente come la concentrazione minima capace di fornire un segnale 3,3 volte maggiore del noise. Il rumore di fondo è stato misurato nell'intervallo di tempo 4-5 min in tre diverse corse cromatografiche ottenute da un pool di plasma preparato da campioni di soggetti non in terapia, mentre la concentrazione di 0,1 µg/mL è stata verificata per diluizioni scalari dello standard di calibrazione nello stesso pool.

Il limite di quantificazione (inteso come la concentrazione in grado di fornire un segnale 10 volte maggiore del rumore di fondo) è di 0,3 µg/mL.

La linearità è stata valutata nell'intervallo di concentrazioni 0,3-18 µg/mL. Sono state preparate tre rette di calibrazione per diluizione dello standard di calibrazione con plasma di pazienti non in terapia nell'intervallo 0,3-9 µg/mL ($r = 0,99990$ (SD 0,0001), eq. della retta $y = 1,112$ (SD 0,0117) $x - 0,04$ (SD 0,043)), e tre rette di calibrazione per addizione di uno standard chimico a plasma di soggetti

non in terapia nell'intervallo 0,3-18 µg/mL ($r = 0,99965$ (SD 0,0002), eq. della retta $y = 1,119$ (SD 0,007) $x - 0,162$ (SD 0,022)). Le due serie di calibrazione hanno mostrato una differenza della pendenza statisticamente non significativa (test di Student bilaterale, $t_{\text{calcolato}} < t_{\text{tabulato}}$ al livello di significatività del 5 con 4 gdl).

Le prove recupero sono state effettuate su cinque diverse concentrazioni preparate in triplo all'interno dell'intervallo di linearità: 0,3µg/mL (recupero 83 %), 3,0 µg/mL (recupero 100-102 %), 6,0 µg/mL (recupero 92-95 %), 9,0µg/mL (100 %), 18,0µg/mL (100-101 %).

DISCUSSIONE

Con la tecnica HPLC oltre ai farmaci antiepilettici più classici (dosati anche con metodi immunoenzimatici) è possibile dosare anche quelli di più recente uso terapeutico come la lamotrigina e la 10,11-diidro-10-idrossicarbamazepina. In letteratura si trovano articoli che illustrano il dosaggio della lamotrigina come singolo analita(10-12) o in associazione con uno o più farmaci antiepilettici con tecniche che prevedono preparazioni e condizioni strumentali differenti(13-18).

Il contributo che questo articolo vuole portare è quello di indicare un sistema semplice e rapido che, con la stessa preparazione e con le stesse condizioni strumentali, permetta di dosare simultaneamente la lamotrigina ed un ampio pannello di altri farmaci antiepilettici.

Questo è reso possibile dalla efficiente separazione tra la lamotrigina e il DHC nella stessa corsa cromatografica e dall'assenza di coeluzioni da parte di altri farmaci o loro metaboliti. In Fig. 1- A e 1-B sono riportati i tracciati cromatografici ottenuti dallo standard di calibrazione contenuto nel kit, e quello ottenuto dal plasma di un paziente sottoposto a terapia anticonvulsivante con lamotrigina e oxcarbazepina. La selettività del metodo è stata valutata anche tramite preparazione di un siero di controllo per farmaci (Seronorm Pharmaca L-1 lotto N02519 della Sero AS, componenti e concentrazioni riportate nella Tab.1) dove si evidenzia l'assenza di coeluzioni sulla lamotrigina per un numero molto elevato di sostanze.

BIBLIOGRAFIA

1. Menge GP, Dubois JP, Bauer G. Simultaneous determination of carbamazepine, oxcarbazepine and their main metabolites in plasma by liquid chromatography. *J Chromatogr* 1987; 414: 477-483.
2. Elyas AA, Goldberg VD. Simple and rapid micro-analytical high-performance liquid chromatographic technique for the assay of oxcarbazepine and its primary active metabolite 10 hydroxycarbamazepine. *J Chromatogr* 1990; 528: 473-479.
3. Grant SM, Faulds D. Oxcarbazepine. A reviews of its pharmacology and therapeutic potential in epilepsy, trigeminal neuralgia and effective disorders. *Drugs* 1992; 43:873-888.
4. Albani F, Contin M, Riva R, Baruzzi A. Il monitoraggio terapeutico dei nuovi farmaci antiepilettici: indicazioni cliniche e metodi di analisi. *LigandAssay* 2000; 5(1): 53-61.
5. Patsalos PN. New antiepileptic drugs. *Ann Clin Biochem.* 1999; 36:10-19.

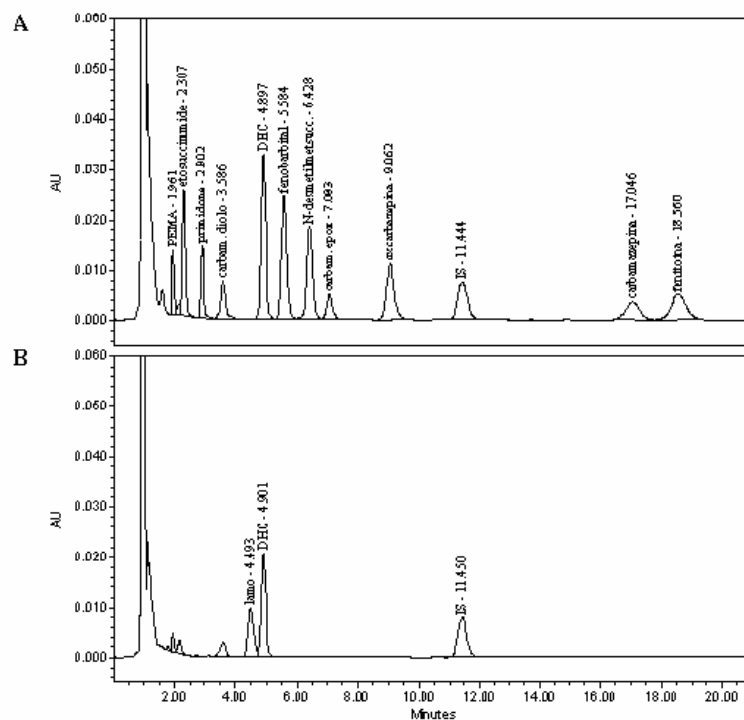


Figura 1

A tracciato cromatografico ottenuto dallo standard di calibrazione del kit FARMACI AED (Microlina). **B** tracciato cromatografico ottenuto dal plasma di un soggetto in terapia con lamotrigina e oxcarbazepina. Le altezze corrispondono a concentrazioni di 5,6 g/mL per la lamotrigina e 15,0 g/mL per DHC.

Tabella 1

Componenti e concentrazioni attese del siero di controllo per farmaci. Seronorm pharmaca L1 lotto N02519

analita	concentrazioni attese
Amicacina	9,0-10,4 mg/L
Amiodarone	1 mg/L
Caffeina	18,1-22,5 mg/L
Clonazepam	5 µg/L
Cloramfenicolo	5 mg/L
Ciclosporina	100 µg/L
Desipiramina	73,4-104,6 µg/L
Diazepam	300 µg/L
Digitossina	41,2-48,0 µg/L
Diisopiramide	2 mg/L
Flecainide	0,4 mg/L
Gantamicina	3,3-3,7 mg/L
Aloperidolo	10 µg/L
Imipramina	74,3-93,9 µg/L
Lidocaina	2 mg/L
Metotressato	36,3-45,4 µg/L
Netilmicina	5 mg/L
Nortriptilina	31,8-44,8 µg/L
paracetamolo	86,8 100,6 mg/L
Procainammide	3 mg/L
Propanololo	20 µg/L
Quinidina	2 mg/L
Acido salicilico	160-224 mg/L
Teofillina	4,7-5,1 mg/L
Acido valproico	24,7-27,9 mg/L
vancomicina	9,5-11,3 mg/L

- Filton A, Goa KL. Lamotrigine. *Drugs* 1995; 50: 691-713
- Fraser AD, Jenkins AJ. Recent Advances in drug therapy for the treatment of epilepsy. *Ther Drug Monit Toxicol* 1996; 17: 87-103.
- Warner A, Privitera M, Bates D. Standard of laboratory practice: antiepileptic drug monitoring. *Clin Chem* 1998; 44: 1085-1095.
- Chong E, Dupuis LL. Therapeutic drug monitoring of lamotrigine. *Ann Pharmacother* 2002; 36(5): 917-920.
- Yamashita S, Furuno K, Kawasaki H, Gomita Y, Yoshinga H, Yamatogi Y, Ohtahara S. Simple and rapid analysis of lamotrigine, a novel antiepileptic, in human serum by high-performance liquid chromatography using a solid-phase extraction technique. *J Chromatogr B* 1995; 670: 354-357.
- Fraser AD, MacNeil W, Isner AF, Camfield PR. Lamotrigine analysis in serum by high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 174-178.
- Bottiger Y, Svensson JO, Stahle L. Lamotrigine drug interaction in a TDM material. *Ther Drug Monit* 1999; 21(2): 171-174.
- Lensmeyer GL, Gidal BE, Wiebe DA. Optimized high-performance liquid chromatographic determination of lamotrigine in serum with concomitant determination of phenytoin, carbamazepine, and carbamazepine epoxide. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 292-300.
- Queiroz MEC, Carrilho E, Carvalho D, Lancas FM. Comparison of high-resolution gas chromatography and high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of lamotrigine and carbamazepine in plasma. *Chromatographia* 2001; 53: 485-489.
- Dumortier G, Pons D, Zerrouk A, Januel D, Saba G, Degrasat K. Concomitant HPLC method for determination of lamotrigine, carbamazepine, and 10,11-carbamazepine epoxide in plasma using 240-220 nm wavelength detection. *J Liq Chromatogr* 2001; 24(20): 3171-3180.

16. Queiroz MEC Silva SM, Carvalho D. Determination of lamotrigine simultaneously with carbamazepine, carbamazepine epoxide, phenytoin, phenobarbital, and primidone in human plasma by SPME-GC-TSD. *J Chromatogr Science* 2002; 40(4): 219-223
17. Lancas FM, Sozza MA, Queiroz MEC. Simultaneous plasma lamotrigine analysis with carbamazepine, carbamazepine 10,11-epoxide, primidone, phenytoin, phenobarbital, and PEMA by micella electrokinetic capillary chromatography (MECC). *J Anal Toxicol* 2003; 27(5): 3-5.
18. Cangiano G, Latte A, Boscaglia M, Marzillo L, Nigriello E, Scoppa S, Risitano A, D'Armora M. Applicazioni cromatografiche nella determinazione di alcuni farmaci antiepilettici. *Biochim Clin* 2004; 28(2): 246-249.