

Applicazioni cromatografiche nella determinazione di alcuni farmaci antiepilettici

Giovanni Cangiano¹, Annachiara Latte², Marianna Boscaglia², Laura Marzillo², Enza Nigriello², Silvio Scoppa², Andrea Risitano¹, Maurizio D'Amora²

Azienda Sanitaria Locale Napoli 1:

1Laboratorio di Patologia Clinica - P.O. dei Pellegrini

2Laboratorio di Patologia Clinica - P.O. S.M. del P. degli Incurabili

ABSTRACT

Chromatographic applications in the measurement of antiepileptic drugs

In this work two new chromatographic assays are presented for the measurements of lamotrigine and 10-oxi ferumal carbazepine: the former is performed in HPLC-UV technique with isocratic system in Chromat 3 reversed phase and latter with the Remedi multicolumn system. Measurements are easily performed more over, samples can be quickly assayed with the above mentioned instrumentation which is usually available in emergency sectors of clinical pathology laboratories: quick and effective therapeutic monitoring is possible even if phenobarbital has been assumed by the patient.

RIASSUNTO

Col presente lavoro vengono proposte due nuove metodiche cromatografiche per la determinazione della lamotrigina e della 10-idrossi-carbazepina sierica, effettuate rispettivamente in HPLC-UV col sistema isocratico a fase inversa Chromat 3 e con il sistema multicolonnare Remedi. Le analisi non mostrano difficoltà di esecuzione e possono essere rapidamente eseguite con la strumentazione sopra citata, di uso diffuso nei settori di urgenza dei laboratori di patologia clinica, e permettendo quindi un rapido ed efficace monitoraggio terapeutico anche in presenza di somministrazione di fenobarbitale.

INTRODUZIONE

Gli antiepilettici sono farmaci indicati nella terapia sintomatica delle varie forme di epilessia (1). Essi possono agire bloccando i canali del sodio, potenziando la trasmissione gabaergica, bloccando i canali del calcio di tipo T nei neuroni talamici ed utilizzando ulteriori meccanismi di azione, spesso tra loro combinati (2,3,4).

Rispetto ai farmaci tradizionali (fenobarbitale, carbamazepina, fenitoina, ecc.) quelli di più recente introduzione presentano generalmente una elevata biodisponibilità, uno scarso legame proteico, una maggiore emivita tale da consentire due sole somministrazioni giornaliere (o anche una), una minore interazione con altri farmaci ed una migliore tolleranza (5,6,7). Hanno però lo svantaggio che le loro concentrazioni nel sangue (o nel plasma) non possono essere misurabili singolarmente con i più comuni metodi immunometrici e pertanto necessitano di tecniche più sofisticate per la loro determinazione.

Col presente lavoro si evidenzia l'utilità di alcuni dosaggi cromatografici effettuati sia con HPLC tradizionale che con il sistema multicolonnare Remedi-HS e finalizzati alla ricerca sierica della lamotrigina e del principale metabolita dell'oxcarbazepina, la 10-idrossi-carbazepina (DHC).

In questo lavoro si analizza una esperienza trimestrale, relativa al periodo gennaio-marzo 2003, in cui sono stati analizzati 95 campioni di siero appartenenti a pazienti in terapia con diversi antiepilettici ed afferenti presso alcuni laboratori di Patologia Clinica distrettuali ed ospedalieri dell'Azienda Sanitaria Locale Napoli 1 (ASL NA 1). Le analisi sono state eseguite in HPLC con sistema isocratico a fase inversa sullo strumento Chromat 3 della ditta Bio-Rad (Milano, Italia), con il relativo kit di antiepilettici II (fase mobile costituita da metanolo < 35% ed acetonitrile, colonna di estrazione a fase inversa contenente 100 mg di silice, reagente condizionante contenente metanolo) ed utilizzando una lunghezza d'onda di 210 nm, una temperatura di 40°C, un volume campione di 0,05 mL ed un flusso di 1,4 mL/min. In tali condizioni operative il sistema evidenzia coeluzione della lamotrigina e della DHC con il fenobarbitale.

La figura 1 illustra la corsa cromatografica di un calibratore antiepilettici effettuato col sistema HPLC Chromat 3 alla lunghezza d'onda di 210 nm.

La determinazione da noi proposta per la determinazione della lamotrigina (LAM) si serve della stessa strumentazione sopra citata, degli stessi parametri operativi e dello stesso reagentario apportando però alcune variazioni rappresentate dalla modifica della lunghezza d'onda a 330 nm, del volume di siero raddoppiato (0,2 mL) e dello standard interno (0,2 mL di diazepam 0,5 mg/mL) utilizzati nella fase estrattiva. In figura 2 viene rappresentato il

MATERIALI E METODI

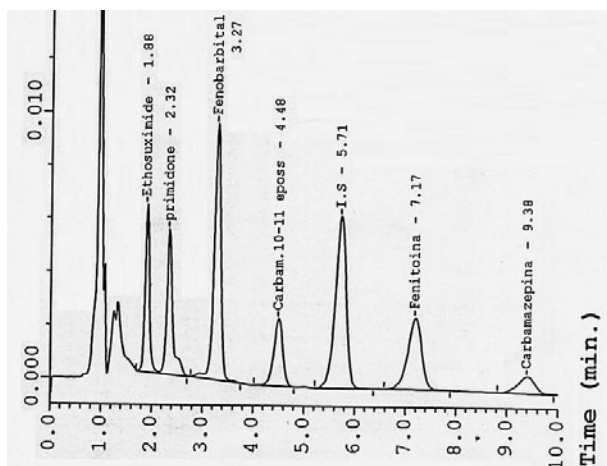


Figura 1
cromatogramma antiepilettici sistema Chromat 3- 210 nm

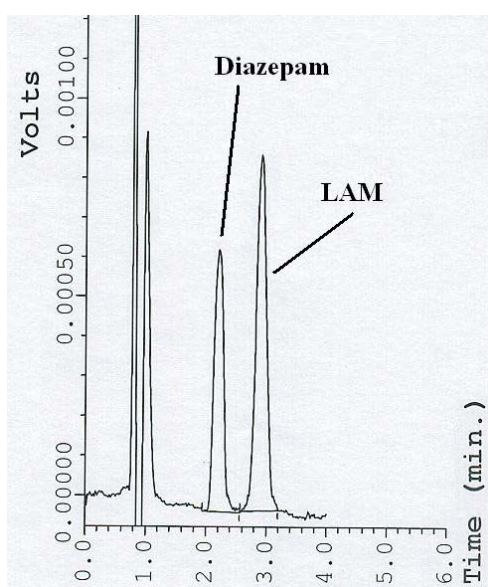


Figura 2
cromatogramma LAM - sistema Chromat 3 - 330 nm

cromatogramma di calibrazione (5,5 µg/mL di LAM). (8,9)

Determinazioni alternative della DHC sono state eseguite con tecnica cromatografica in HPLC - sistema multicolumna Remedi HS - della ditta Bio-Rad (Milano, Italia), completamente automatico e costituito da 5 diversi reagenti dedicati pronti all'uso e da 5 colonne con funzioni diverse. La corsa cromatografica necessita di un tempo non superiore ai 18 minuti e l'identificazione della DHC si effettua per con-

fronto con i dati presenti nella libreria dello strumento (tempo di ritenzione di circa 1,4 minuti, massimo di assorbimento evidenziato alla lunghezza d'onda di 278 nm, rapporti di ritenzione relativi agli standard interni N-etil nordiazepam e clorfeniramina, rispettivamente di RRT1 = 0,084 ed RRT2 = 0,017, ecc.) (10,11,12). La metodica consiste nel diluire il siero con acqua distillata nel rapporto di 1:5; ad 1,0 mL di tale soluzione vengono aggiunti 0,2 mL di standard interni. La miscela è quindi esaminata su Remedi-HS dopo centrifugazione a 10000 giri per 5 minuti. La figura 3 illustra il cromatogramma di un campione di siero diluito che evidenzia il picco della DHC (picco 1), identificato con il primo standard interno n-etil nordiazepam (IS1) ed associato ad una concentrazione di 12,5 g/mL grazie al rapporto con il secondo standard interno clorfeniramina (IS2) (13).

Le elaborazioni statistiche, effettuate con Excel 2000 (14), si riferiscono a profilo di imprecisione e recupero estrapolate nell'intervallo analitico 0,2-20 µg/mL per la lamotrigina e 3-15 µg/mL per il DHC.

RISULTATI

In figura 4 e 5 sono rappresentati i profili di imprecisione delle determinazioni cromatografiche della LAM e della DHC: nell'intervallo 0,2-20 µg/mL della LAM si evidenzia un coefficiente di variazione percentuale non superiore al 3% mentre nell'intervallo 3-15 µg/mL della DHC si evidenzia un coefficiente di variazione percentuale non superiore al 4% .

Nelle figure 6 e 7 vengono mostrati i recuperi percentuali ricavati da campioni a titolo elevato di LAM e di DHC progressivamente diluiti con soluzione salina: si ottengono risultati compresi tra il 106,9 ed il 127,8% per la LAM e tra il 94,3 ed il 120,1 per la DHC.

Le prove di precisione nella serie (n=20) e tra le serie (20 giorni lavorativi), effettuate per controlli a titolo noto della LAM e della DHC, mostrano CV% inferiori al 5% , così come illustrate nelle figure 8 e 9.

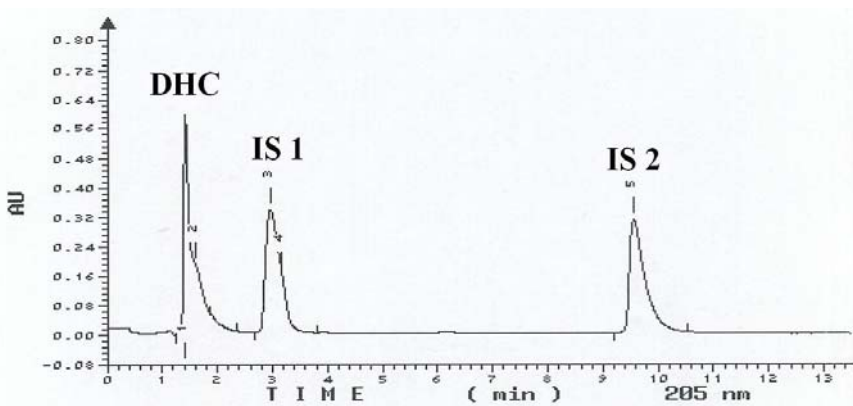


Figura 3
cromatogramma DHC sistema Remedi-HS

DISCUSSIONE

Il metodo da noi proposto per la misura della lamotrigina, effettuato in HPLC con sistema isocratico a fase inversa sullo strumento Chromat 3, non presenta alcuna interferenza con la rilevazione del fenobarbitale, antiepilettico spesso somministrato in associazione alla lamotrigina stessa.

Rispetto al metodo tradizionale, caratterizzato da simili tempi di ritenzione per fenobarbitale e lamotrigina, la metodica proposta non mostra alcuna difficoltà nell'estrazione su colonnina, utilizza il diazepam come standard interno e consente di eseguire la determinazione della lamotrigina, nel range analitico 0,2 - 20 µg/mL, in un tempo inferiore ai 4 minuti. E' possibile sfruttare inizialmente l'estrazione tradizionale per la determinazione degli antiepilettici (ed in particolare

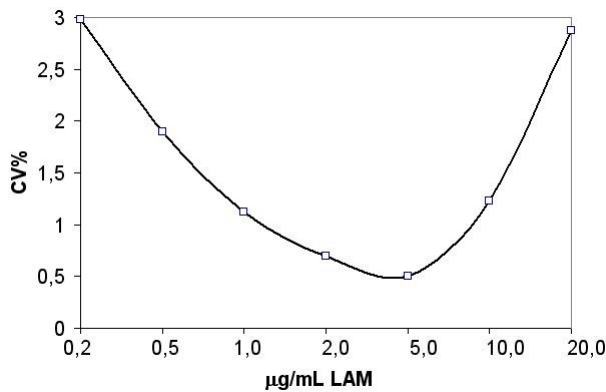


Figura 4
profilo di imprecisione della LAM - sistema Chromat 3 - 330 nm

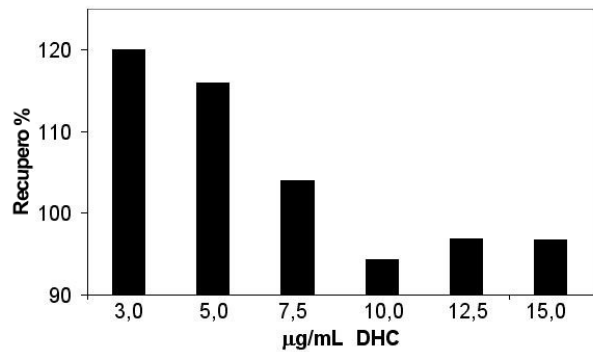


Figura 7
prove di recupero della DHC - sistema Remedi-HS

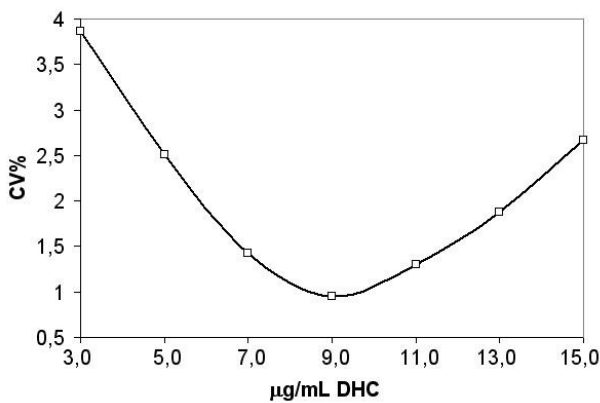


Figura 5
profilo di imprecisione della DHC - sistema Remedi-HS

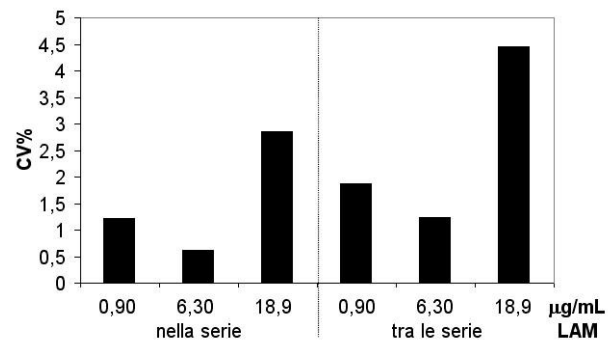


Figura 8
prove di precisione della LAM - sistema Chromat 3 - 330 nm

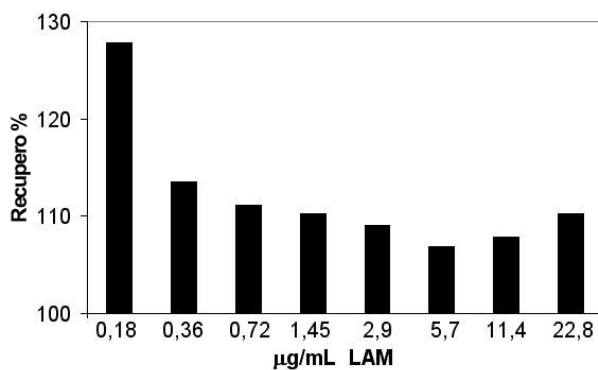


Figura 6
prove di recupero della LAM - sistema Chromat 3 - 330 nm

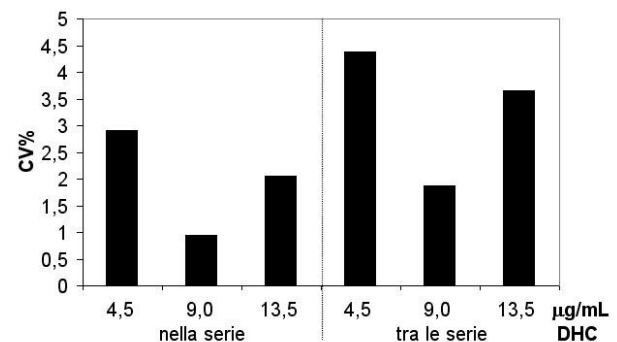


Figura 9
prove di precisione della DHC - sistema Remedi-HS

del fenobarbitale), effettuata alla lunghezza d'onda di 210 nm ed in un tempo di circa 10 minuti, per poi utilizzarla successivamente alla lunghezza d'onda di 330 nm, con buona approssimazione (riduzione del volume di siero ed assenza di standard interno) per la lamotrigina.

Le stesse interferenze cromatografiche rilevate sul Chromat 3 ed utilizzando il kit Antiepilettici, valgono anche per la DHC: in tal caso la determinazione da noi proposta ed effettuata in HPLC col sistema multicolonnare Remedi in un tempo di circa 18 minuti, necessita solamente di una semplice diluizione del siero in esame con acqua distillata (1:5). Valori inferiori o superiori all' intervallo analitico di 3-15 µg/mL della DHC possono essere rilevati cambiando opportunamente le diluizioni del campione sierico (generalmente 1:3 per concentrazioni inferiori ai 3 µg/mL ed 1:10 per concentrazioni superiori ai 15 µg/mL).

Ambedue i metodi proposti mostrano buoni profili di imprecisione (CV% < 3% per la LAM e CV% < 4% per la DHC), discrete prove di precisione (CV% < 5% sia per la LAM che per la DHC) ed accettabili prove di recupero (106,9 - 127,8% per la LAM e 94,3 - 120,1 per la DHC).

Le metodiche proposte per la determinazione della lamotrigina e della 10-idrossi carbazepina sierica non mostrano difficoltà di esecuzione e possono essere rapidamente eseguite con strumentazione di uso diffuso nei laboratori di patologia clinica permettendo quindi un rapido ed efficace monitoraggio terapeutico anche in presenza di fenobarbitale.

La semplicità delle metodiche proposte può trovare applicazione anche nei settori di urgenze di alcune strutture ospedaliere di grande recettività in cui lo specifico settore è attrezzato di strumentazione HPLC.

BIBLIOGRAFIA

1. Kuschinsky G, Lüllmann H. Farmacologia e tossicologia. Piccin 1998; 312-17.
2. Gatti G, Fattore C, Leone L et al. I nuovi farmaci antiepilettici: aspetti farmacologica e clinici. Ligand Assay 1998; 3: 30-40.
3. Leach JP. Polypharmacy with anticonvulsivants. Focus on synergism. CNS Drugs 1997; 8: 366-75.
4. McLean MJ, Schmutz M, Wamil AW et al. Oxcarbazepine: mechanisms of action. Epilepsia 1994; 35 (suppl. 3): 5-9.
5. Perucca E. The new generation of antiepileptic drugs: advantages and disadvantages. Brit J Clin Pharmacol 1996; 42: 431-43.
6. Rambeck B, Wolf P. Lamotrigine Clinical Pharmacokinetics. Clin Pharmacokinet 1993; 25: 433-43.
7. Grant SM, Faulds D. Oxcarbazepine. A reviews of its pharmacology and therapeutic potential in epilepsy, trigeminal neuralgia and effective disorders. Drugs 1992; 43: 873-88.
8. Croci D, Salmaggi A, de Grazia U, Bernardi G. New high-performance liquid chromatographic method for plasma/serum analysis of lamotrigine. Ther Drug Monit 2001; Dec, 23 (6): 665-8
9. Cangiano G, Manera B, Cimmino A, D'Amora M et al. Dosaggio cromatografico (HPLC) della lamotrigina sierica in pazienti con terapia aggiuntiva di fenobarbitale. Biochim Clin 2002;3:244.
10. Carlucci G. Cromatografia liquida ad alta efficienza (HPLC). Applicazione all'analisi di farmaci in matrici biologiche. Libreria Universitaria Benedetti. L'Aquila. 2000.
11. Bovati ML, Delor de Ferrabonc F, Donzelli G, Tamburini M. Aspetti teorici e applicazioni cliniche in HPLC. Bio-Rad. 1995.
12. Gheduzzi A, Rovida C. L'analisi HPLC in fase inversa: lavorare nelle condizioni ottimali. Chemtek Analitica srl - Angola Emilia. 2001.
13. Cangiano G, D'Amora M, Giardiello D, Fiore R et al.. Dosaggio cromatografico (HPLC) della 10-idrossi carbazepina sierica. Biochim Clin 2003;suppl. 3:117.
14. Kelly J. Excel 2000. Guida completa. Editore Apogeo. 1999.