

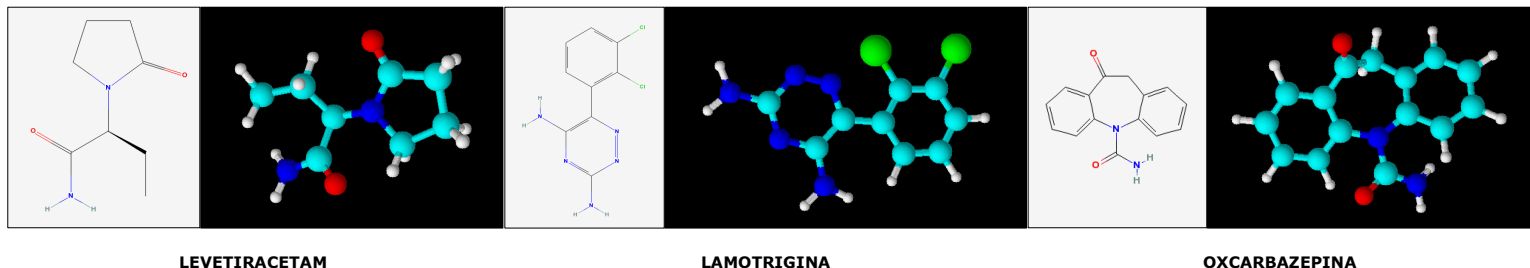
# DETERMINAZIONE IN HPLC DI LEVETIRACETAM, LAMOTRIGINA E OXCARBAZEPINA

P. Porta<sup>1</sup>, M. Bagnati<sup>2</sup>, M. Vidal<sup>1</sup>, M. Basile<sup>1</sup>, R. Cantello<sup>2</sup>, C. Civardi<sup>2</sup>, A. Fortina<sup>1</sup>, C. Cassani<sup>1</sup>, N. Atzeni<sup>1</sup>, M. Albertario<sup>1</sup>, M. Bertinazzi<sup>1</sup>, C. Boieri<sup>1</sup>, D. Scarano<sup>1</sup>, G. Bellomo<sup>1</sup>  
1 Laboratorio di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara  
2 Clinica Neurologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

## INTRODUZIONE E SCOPO.

Levetiracetam (LEVE), lamotrigina (LAMO) e oxcarbazepina (OCBZ) sono frequentemente utilizzati come farmaci in monoterapia o in associazione per il trattamento delle crisi parziali con o senza generalizzazione secondaria e per le crisi tonico-cloniche. Come per altri farmaci antiepilettici, il loro monitoraggio plasmatico gioca un ruolo rilevante nella valutazione dell'efficacia terapeutica, nell'ottimizzazione della terapia e nel controllo delle interazioni farmacologiche.

Scopo del lavoro è stato sviluppare una metodica in HPLC di semplice e rapida esecuzione utile nel monitoraggio terapeutico di pazienti con epilessia.



Il **levetiracetam**, assorbito quasi completamente, è scarsamente legato alle proteine (<10%) ed eliminato con le urine in gran parte immodificato (66%) o sotto forma di un metabolita inattivo derivato dall'idrolisi enzimatica del gruppo acetamidico della molecola. Tra gli effetti collaterali si presentano vertigini, astenia e sonnolenza.

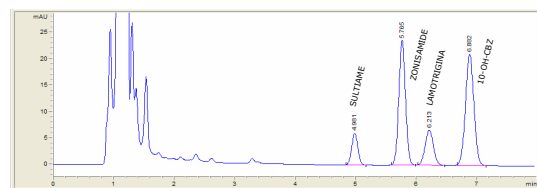
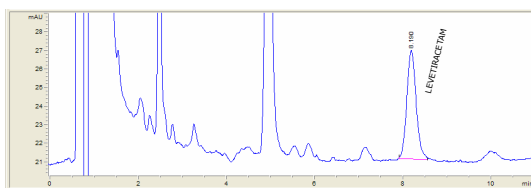
La **lamotrigina** è assorbita quasi completamente nel tratto gastrointestinale e legata alle proteine per il 55%. Il farmaco non subisce un metabolismo di primo passaggio e viene eliminato dopo glucuronazione con le urine. Tra gli effetti collaterali si presentano vertigini, cefalea, diplopia, nausea, vomito, sonnolenza ed eruzioni cutanee.

L'**oxcarbazepina** (OCBZ), un analogo della carbamazepina (CBZ) con un gruppo chetonico in posizione 10, è essenzialmente un profarmaco, che dopo assorbimento, è rapidamente e completamente ridotto nel suo metabolita attivo (**10,11-diidro-10-idrossi-carbamazepina** o **10-OH-CBZ**) responsabile dell'attività anticonvulsivante della OCBZ. L'OCBZ è completamente (≥96%) e rapidamente assorbita dal tratto gastrointestinale, e si presenta associata alle proteine per circa il 60%. L'OCBZ è quasi totalmente eliminata per via renale dopo glucuronazione. Gli effetti collaterali più comuni sono sonnolenza, vertigine, cefalea e rush cutanei, e in misura minore disturbi della funzione cognitiva e reazioni idiosincrasiche.

## PAZIENTI E METODI.

I dosaggi di 10-OH-CBZ, della lamotrigina e del levetiracetam sono stati eseguiti su sangue di pazienti afferenti al reparto di Neurologia dell'Azienda Ospedaliera "Maggiore della Carità" di Novara e al reparto di Neurologia di Borgomanero.

Il plasma, dopo prelievo venoso, viene separato per centrifugazione e conservato a -20°C fino al momento dell'analisi. 100 µl di plasma sono deproteinizzati con 200 µl di acido metafosforico 10%. Dopo centrifugazione, 200 µl di surnatante sono diluiti con 200 µl (LEVE) o 400 µl (LAMO/OCBZ) di fase mobile e analizzati in HPLC. Gli standard a concentrazione nota sono stati preparati in plasma utilizzando soluzioni standard madre alla concentrazione di 1 mg/ml. Come calibratore si utilizza un pool di sieri bianchi a cui è stata aggiunta una quantità nota di standard. L'oxcarbazepina viene valutata tramite dosaggio del suo metabolita attivo 10-OH-CBZ.



Chromatogrammi di Levetiracetam (a sinistra), Lamotrigina e 10-OH-CBZ (a destra) ottenuti utilizzando un HPLC Agilent serie 1100 con rivelatore DAD e software Chemstation fornito dalla ditta BIO-RAD. Si può osservare come nella stessa corsa cromatografica di LAMO e OCBZ sia possibile dosare anche sultiame e zonisamide. Il cromatogramma di destra è stato ottenuto utilizzando un calibratore BIO-RAD.

Parametro analitico HPLC	Levetiracetam	Lamotrigina / Oxcarbazepina
Colonna	BIO-RAD C8 100 mm x 4.6 mm, 5 µm	Agilent Eclipse XDB C18 150 mm x 4.6 mm, 5 µm
Rivelazione	UV a 212 nm	UV a 212 nm
Fase mobile	tampone fosfato 20 mM pH 6, acetonitrile 3% (v/v)	tampone fosfato 20 mM pH 6,5, acetonitrile 20% (v/v)
Volume di iniezione	25 µl	25 µl
Flusso	1 ml/min	1,2 ml/min
Temperatura colonna	30 °C	30 °C

## RISULTATI.

Il metodo per il levetiracetam è lineare tra 0,5 e 100 mg/l, con un limite di sensibilità di 0,2 mg/l, RSD di 2,3% e recupero pari al 93%. Il metodo per la lamotrigina e l'oxcarbazepina è lineare rispettivamente tra 1 e 100 mg/l e tra 0,5 e 80 mg/l, con un limite di sensibilità di 0,3 mg/l, RSD di 1%, recupero pari a 67% (LAMO), e 0,1 mg/l, RSD 0,6% e recupero pari a 75% (OCBZ). I range di linearità investigati coprono un intervallo di concentrazioni maggiore dei range terapeutici (LEVE 5-30 mg/l, LAMO 3-14 mg/l, 10-OH-CBZ 0,5-80 mg/l).

Da maggio 2006 a giugno 2008 nel nostro laboratorio sono state effettuate 336 determinazioni per OCBZ (media 15,9 mg/l; ds 8,5; min-max 0,1-48,2), 190 per LAMO (media 5,1 mg/l; ds 3,6; min-max 0,3-18,6) e 93 per LEVE (media 21,7 mg/l; ds 19,4; min-max 0,2-121).

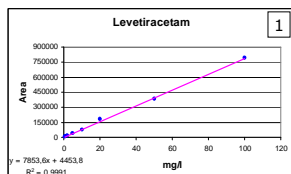
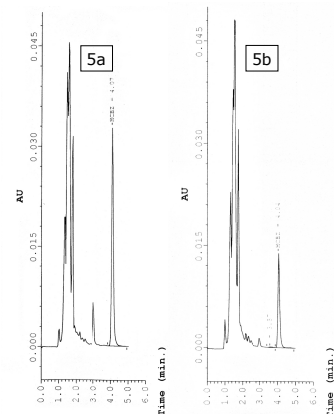
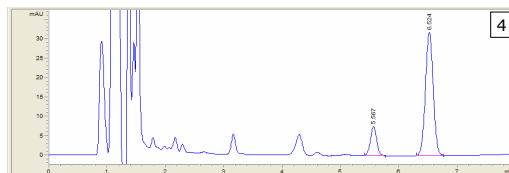
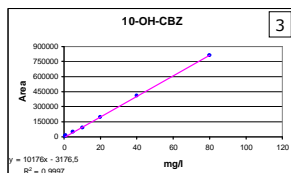
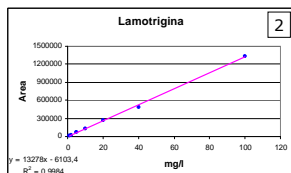


Figure 1-3: Curve di calibrazione di Levetiracetam, Lamotrigina e 10-OH-CBZ.

Figure 4: Cromatogramma di un paziente in terapia combinata zonisamide e oxcarbazepina ottenuto con un HPLC Agilent serie 1100.

Figure 5a e 5b: Cromatogrammi di esempio di un paziente in sovradosaggio (29.62 mg/l di 10-OH-CBZ) (A) e di un paziente in range terapeutico (12.56 ng/ml di 10-OH-CBZ) (B), ottenuti utilizzando una stazione HPLC Hp1100 fornito dalla ditta BIO-RAD.



## CONCLUSIONI.

Dai dati ottenuti in questo lavoro si nota innanzitutto la necessità di preparare gli standard in matrice biologica. Le metodiche descritte sono rapide (tempo complessivo inferiore a 15 min), semplici e robuste e consentono la determinazione contemporanea di più farmaci.