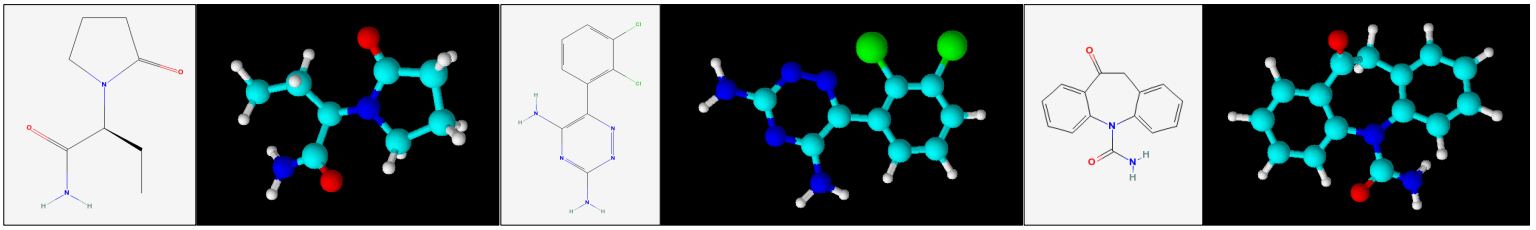
OTTIMIZZAZIONE DEI METODI PER IL DOSAGGIO DI ANTIEPILETTICI NELLA ROUTINE DI UN LABORATORIO ANALISI

M. Bagnati, M. Vidali, M. Albertario, N. Atzeni, D. Scarano, P. Porta, G. Tornotti, G. Bellomo
Laboratorio di Ricerche Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

INTRODUZIONE E SCOPO.

Le richieste di dosaggio di antiepilettici di nuova generazione sono in continuo aumento. In particolare, nel nostro Laboratorio il numero di determinazioni per lamotrigina (LAMO), oxcarbazepina (OCBZ) e levetiracetam (LEVE) sono aumentate da 276 (80 LAMO, 164 OCBZ, 32 LEVE) nel 2007 a 511 (128 LAMO, 181 OCBZ, 202 LEVE) nel 2008 e a 1065 (238 LAMO, 305 OCBZ, 521 LEVE) nel 2009 (previsione a 12 mesi basata sui dati gennaio-luglio). Due metodi analitici (LAMO/OCBZ e LEVE) precedentemente validati, completamente differenti per preparativa e analisi HPLC, sono stati ottimizzati per rispondere più appropriatamente alle richieste dei pazienti.



LEVETIRACETAM **LAMOTRIGINA** **OXCARBAZEPINA**

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.

La preparazione e l'analisi (fase mobile e colonna) dei campioni sono state uniformate: 100 µl di plasma sono deproteinizzati con 200 µl di acido metafosforico 5% (w/v); dopo centrifugazione, 200 µl di surnatante sono diluiti con 300 µl di tampone fosfato 20 mM pH 6,53. L'analisi è condotta in un Agilent 1200 HPLC-DAD con colonna C18 100 mm x 4,6 mm, 3,5 µm, lettura 212 nm, flusso 1,2 ml/min, volume di iniezione 20 µl, fase mobile costituita da tampone fosfato 20mM pH 6,53 (A) e acetonitrile (B). 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.
Prima vengono caricati i campioni analizzati per LAMO/OCBZ (A 81%, B 19%), a cui seguono 5 min (A 100%) e 5 min (A 97% e B 3%), e successivamente i campioni per LEVE (A 97% e B 3%) (Figura 1).

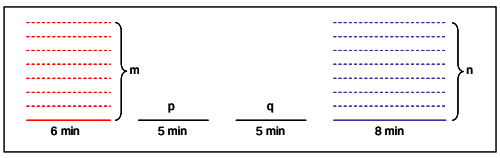
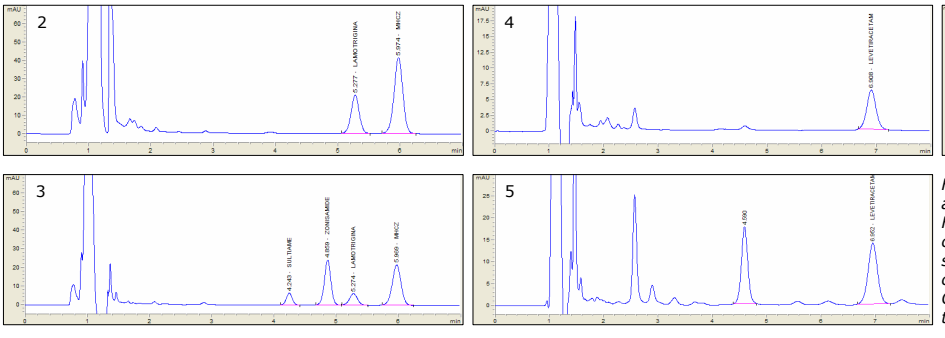


Figura 1: Tempi di analisi caratteristici del nuovo metodo ottimizzato. Dopo una preparativa comune, inizialmente vengono analizzati tutti i campioni per Lamotrigina e 10-OH-CBZ, per una durata di 6 min/test; al termine dopo 10 min (5 min di precondizionamento + 5 min di condizionamento) vengono analizzati i restanti campioni per Levetiracetam, per una durata di 8 min/test. Fase mobile costituita da tampone fosfato 20mM pH 6,53 (A) e acetonitrile (B). m: numero campioni LAMO/OCBZ con A 81% e B 19%; p: precondizionamento con A 100%; q: condizionamento con A 97% e B 3%; n: numero campioni LEVE con A 97% e B 3%.
Es. tempistiche con 20 campioni LAMO/OCBZ e 15 campioni LEVE: 6 min x 20 (m) + 5 min (p) + 5 min (q) + 8 min x 15 (n) = 250 min.

RISULTATI.

I dati della nuova validazione sono sovrapponibili a quelli della precedente: range di linearità, LOD, imprecisione e accuratezza sono rispettivamente 1-100mg/l (R^2=0,998), 0,3mg/l, 1% e 96% (DS 2,7%) per LAMO; 0,5-80mg/l (R^2=0,999), 0,1mg/l , <1% e 98% (DS 2,4%) per OCBZ; 0,5-100mg/l (R^2=0,999), 0,2mg/l, 2,3% e 105% (DS 4,6%) per LEVE.



L'analisi richiede da 6 min (LAMO/OCBZ) a 8 min (LEVE) (Figure. 2-5). Il metodo consente inoltre la determinazione di zonisamide, fenobarbitale, e etosuccimide (Figura 6).

Figure 2-6: Cromatogrammi ottenuti nelle stesse condizioni preparative e analitiche con il metodo ottimizzato descritto utilizzando una stazione HPLC Agilent 1200 con rivelatore DAD fornito dalla ditta BIO-RAD . 2) calibratore LAMO/OCBZ in matrice; 3) controllo contenente LAMO, OCBZ, sultiame e zonisamide in matrice; 4) calibratore LEVE in matrice; 5) campione di paziente con LEVE; 6) calibratore Etosuccimide in matrice. Ogni picco, prima dell'integrazione e della refertazione, viene identificato tramite comparazione con i relativi spettri UV presenti in libreria.

CONCLUSIONI.

L'ottimizzazione descritta, già implementata in routine, presenta numerosi vantaggi: risparmio di tempo e fase mobile, riduzione della frequenza di errori nella preparazione dei campioni, possibilità di determinare più analiti utilizzando un'unica preparativa (tra gennaio-luglio 2009, 28 pz avevano una richiesta per LAMO/OCBZ e LEVE).