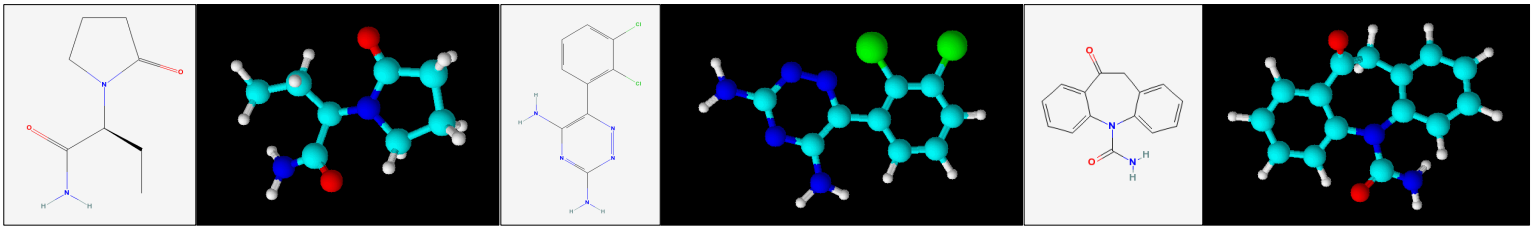
# OTTIMIZZAZIONE DEI METODI PER IL DOSAGGIO DI ANTIEPILETTICI NELLA ROUTINE DI UN LABORATORIO ANALISI

***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).

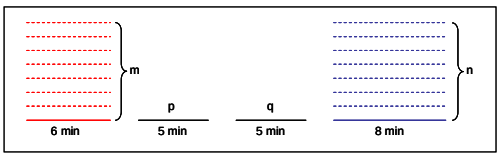
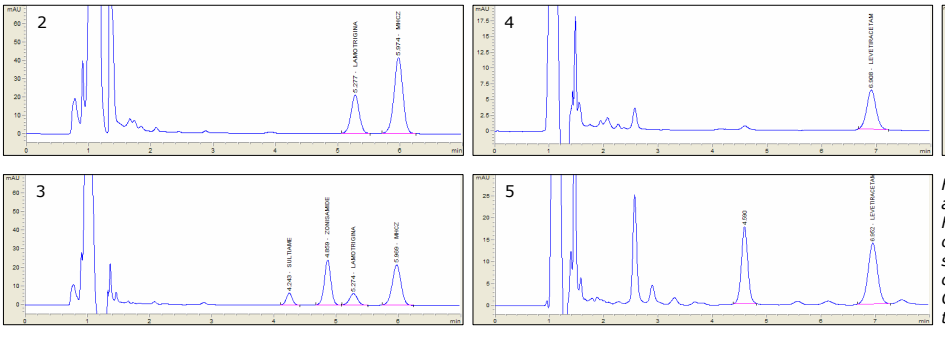



*Figura 1: Tempi di analisi caratteristici del nuovo metodo ottimizzato. Dopo una preparativa comune, inizialmente vengono analizzati tutti i campioni per Lamotrigina e 10-OH-CBZ, per una durata di 6 min/test; al termine dopo 10 min (5 min di precondizionamento + 5 min di condizionamento) vengono analizzati 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).