

*Originalni članci/
Original articles*

ODREĐIVANJE LAMOTRIGINA U SERUMU
PACIJENATA PRIMENOM METODE
TEČNE HROMATOGRAFIJE SA
ULTRA-LJUBIČASTOM DETEKCIJOM

Correspondence to:

Doc. Dr sc. pharm. Snežana Đorđević,

Docent na Katedri za kliničku,
analitičku i eksperimentalnu toksikologiju
i farmakologiju VMA i docent na
Medicinskoj hemiji Visoke medicinske
škole, akademskih studija, VMA
Tel. 011/36-09-481
Mob.tel. 060-336-70-38
E-mail: ivezicnela@yahoo.com

DETERMINATION OF LAMOTRIGINE IN
HUMAN SERUM BY LIQUID CHROMATOGRAPHY
WITH ULTRAVIOLET DETECTION

Branislava Rusić¹, Kristina Denić¹, Snežana Đorđević¹,
Vesna Kilibarda¹, Tomislav Stojanović²

¹Odeljenje za toksikološku hemiju, Centar za kontrolu trovanja,
Vojnomedicinska akademija, Beograd

²Klinika za psihijatrijske bolesti „Dr Laza Lazarević“, Beograd

Ključne reči

lamotrigin, serum, terapijska koncentracija, HPLC-UV

Key words

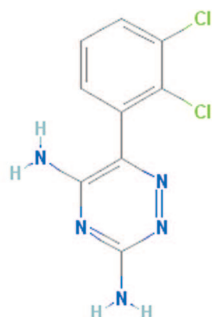
lamotrigin, serum, therapeutic concentrations, HPLC-UV

Apstrakt

Tečna hromatografija sa ultraljubičastom detekcijom (HPLC-UV) je najčešće primenjivana metoda za određivanje antiepileptika novije generacije kojoj pripada i lamotrigin. Precizna i pouzdana HPLC tehnika sa UV detektorom korišćena je za određivanje nivoa lamotrigina u serumu pacijenata. Uzorci su pripremani čvrsto-faznom ekstrakcijom u alkalnoj sredini dodatkom koncentrovanog amonijaka, a zatim podvrgnuti HPLC analizi. Lamotrigin je detektovan na talasnoj dužini od 306 nm. Visokom talasnom dužinom su izbegnute interferencije koje potiču iz uzorka. Linearnost kalibracione krive je u opsegu 0,5-10 mg/L, što pokriva terapijske koncentracije. Koeficijenti varijacije u toku jednog dana i iz dana u dan su manji od 8 %.

UVOD

Lamotrigin je lek iz grupe antiepileptika. Namenjen je za lečenje primarnih i sekundarnih generalizovanih tonično-kloničnih pražnjenja. Primenuje se i kao monoterapija kod bolesnika koji su bili tretirani karbamazepinom, fenitoinom, fenobarbitonom ili nekim drugim antiepileptikom (1).



Slika 1. Hemijska formula lamotrigina

Mehanizam dejstva lamotrigina se objašnjava blokiranjem voltažno zavisnih natrijumovih kanala čime se stabilizuje membrana presinaptičkog neurona i inhibira oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera, posebno glutamata.

Osim kao antiepileptik, lamotrigin može da se koristi i u terapiji neuropatskog bola (dijabetična neuropatija)⁽²⁾ i nekih psihijatrijskih poremećaja (afektivni poremećaji)⁽³⁾. Takođe se može primeniti i u lečenju bipolarnih depresija,

međutim mehanizam njegovog delovanja na raspoloženje još uvek nije poznat. Smatra se da GABA učestvuje u psihopatologiji bolesnika sa bipolarnim oštećenjima. Iako su ispitivanja na zdravim dobrovoljcima pokazala da lamotrigin nema uticaja na nivo GABA-e u plazmi ispitanika on se ipak primenjuje u terapiji bipolarnih poremećaja (4).

Lamotrigin se brzo i praktično potpuno resorbuje iz digestivnog trakta. Prisustvo hrane nema uticaja na resorpciju leka. Apsolutna bioraspoloživost mu je 98 %. Zahvaljujući baznim i lipofilnim svojstvima lamotrigin se dobro distribuira u sve organe i tkiva, a koncentracije u tkivima su veće nego u plazmi. Terapijska koncentracija lamotrigina u serumu je 4-11 mg/L. Maksimalna koncentracija lamotrigina u plazmi se postiže nakon 1,5 do 5 h. Sekundarna maksimalna koncentracija može se videti nakon 4 do 6 h od ingestije. Primenjena doza od 240 mg postiže pik plazma koncentraciju od 3 mg/L. Najveći deo unete doze (70 %) eliminiše se putem bubrega i to 10 % kao nepromenjen lek i 75-90 % u vidu konjugata sa glukouronskom kiselinom (5).

Metoda koja se najčešće koristi za određivanje lamotrigina u biološkom materijalu je HPLC sa UV ili PDA detekcijom. Takođe, mogu se koristiti gasna i tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (6-13).

Cilj ovog rada bio je da prikaže HPLC-UV metodu sa uslovima pripreme uzoraka i određivanja koncentracije lamotrigina u pacijenata na svakodnevnoj terapiji ovim lekom.

MATERIJAL I METODE

Materijal:

Analički standard lamotrigina - 99,9 % w/w (undried), Glaxo Wellcome

Metanol, destilovana voda i acetonitril - J.T.Baker, HPLC Grade purity

Amonijum-hidroksid 32% extra

Hromatografija

Korišćen je HPLC sistem sa binarnom pumpom SpectraSystem P2000, autosampler SpectraSystem AS3000, degazer SpectraSystem SCM1000, detektor Waters 2487 dual λ Absorbance i Clarity Lite Software.

Mobilnu fazu sačinjavala je smeša demineralizovane vode, metanola i acetonitrila (55:20:25) koja je zaalkalisana sa amonijum-hidroksidom do pH 7,5 i degazirana 30 min. na membranskom degazeru.

Protok mobilne faze kroz kolonu Lichrospher 60 RP-select B (5 μ m) 250-4, (Merck) sa pretkolonom Lichrochart 4 - 4 RP-select B na sobnoj temperaturi iznosio je 1,4 mL/min. Injektovano je 50 μ L ekstrakta seruma. Lamotrigin je detektovan na talasnoj dužini od 306 nm i retencionom vremenu od 3,8 minuta na sobnoj temperaturi.

Priprema standardnih rastvora

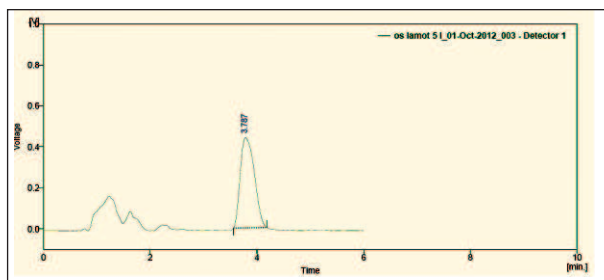
Osnovni standardni rastvor lamotrigina (1 mg/mL) pripremljen je rastvaranjem 10 mg supstance u 10 mL metanola i čuvan na temperaturi od +4 °C. Ostale koncentracije radnih standardnih rastvora dobijene su razblaživanjem osnovnog standarda mobilnom fazom da bi se dobile kalibracione koncentracije od 0,5; 1; 2,5; 5 i 10 mg/L. Ovaj opseg koncentracija je izabran, jer su očekivane koncentracije leka u serumu pacijenata u ovom rasponu.

Priprema uzoraka

Pripremljeno je pet uzoraka seruma opterećenih radnim standardnim rastvorima određenih koncentracija (0,5; 1; 2,5; 5 i 10mg/L). Opterećeni serumu su zaalkalisani konc. amonijakom (1 mL seruma sa 0,1 mL amonijaka), promešani na vorteksu i spremljeni za dalju analizu čvrsto-faznom ekstrakcijom kroz MCX kertridž (Waters Oasis®) na vakuum pumpi. Svaki kertridž je prvo kondicioniran sa 1 mL metanola (100 %) i 1 mL destilovane vode. Nakon nanošenja uzoraka seruma, kertridž je ispran 5 % metanolom. Eluiranje je vršeno 100 % metanolom. Ovakav uzorak je spreman za analizu na HPLC-UV aparatu.

REZULTATI

Svaki uzorak propušan je kroz kolonu na sobnoj temperaturi, na talasnoj dužini 306 nm i pri protoku od 1,4 ml/min. Retenciono vreme za lamotrigin pri ovakvim uslovima bilo je $3,8 \pm 0,2$ min, a ukupno vreme analize 6 min. (Slika 2.).



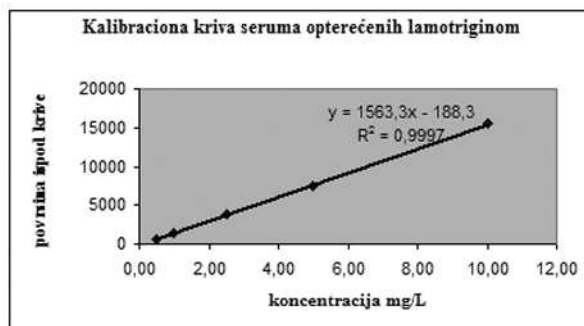
Slika 2. Hromatogram seruma opterećenog lamotriginom

Izračunavanje koncentracija lamotrigina vršeno je na osnovu jednačine kalibracione krive koja je dobijena nakon analize seruma opterećenih standardnim rastvorima (Tabela 1.).

Tabela 1. Zavisnost površina ispod krive od koncentracija lamotrigina

OS konc. mg/L	AUC			Xsr	SD	RSD
0,50	515,7	518,6	505,8	513,37	6,71	1,31
1,00	1509,4	1541,2	1492,9	1514,5	24,55	1,62
2,50	3791,1	3705,4	3746,8	3747,8	42,86	1,14
5,00	7546,8	7648,1	7310,0	7501,6	173,52	2,31
10,00	15085,9	15719,5	15668,1	15491,2	351,91	2,27

Jednačina linearne regresije za lamotrigin bila je $Y=1563,3X - 188,3$. Korelacioni koeficijent za opterećeni serum lamotriginom je 0,9997 (Slika 3).



Slika 3. Kalibraciona kriva seruma opterećenog lamotriginom

U tabeli 2. date su vrednosti standardnih devijacija (stdev), koeficijentata varijacije (cv), limita detekcije (LOD) i limita kvantifikacije (LOQ) za lamotrigin koje su dobijene nakon šest injektovanja koncentracije 0,5 mg/L u toku jednog dana i ponovljeno u toku tri dana.

Tabela 2. Standardne devijacije (STDEV), koeficijenti varijacije (CV), limiti detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za lamotrigin

STDEV	CV (%)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
0,032	6,57	0,09	0,32

Praćenje ponovljivosti metode u jednom danu i iz dana u dan vršeno je sa tri različite koncentracije opterećenih seruma. Dobijeni koeficijenti varijacije prikazani su u Tabeli 3.

Table 3. Koeficijenti varijacije (CV) u toku dana („intra day“) i između dva dana („inter day“) za opterećeni serum

Koncentracija, (mg/L)	Intra day CV (%) serum	Inter day CV (%) serum
0,5	2,35	7,60
2	0,06	2,21
5	0,47	5,47

Metoda je primenjena u praksi u određivanju koncentracija lamotrigina bolesnicima koji su na dugotrajnoj terapiji ovim lekom. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 4.

DISKUSIJA

Postoji više načina za određivanje antiepileptika i njihovih metabolita. Za dokazivanje lamotrigina koriste se hromatografske metode sa PDA, UV i masenom detekcijom (HPLC-PDA, LC-MS, UPLC-MS, GC-MS). Najčešće primjenjivana je tečna hromatografija sa UV detektorom (HPLC-UV) (6).

U ovom radu je prikazana HPLC-UV metoda za određivanje lamotrigina u serumu pacijenata. Uzorci su pripremljeni čvrsto-faznom ekstrakcijom pomoću MCX Oasis kertridža, čime je znatno skraćeno vreme pripreme uzorka. Lamotrigin je detektovan na talasnoj dužini od 306 nm. Pri pH mobilne faze od 7,5 dobijen je najbolji hromatografski odgovor. Koeficijenti varijacije u toku dana i iz dana u dan bili su manji od 8 %.

Tabela 4. Koncentracije lamotrigina u serumu bolesnika

Bolesnici	koncentracija lamotrigina u serumu (mg/L)	Bolesnici	koncentracija lamotrigina u serumu (mg/L)	Bolesnici	koncentracija lamotrigina u serumu (mg/L)
bolesnik 1	3,54	bolesnik 11	3,58	bolesnik 21	0,21
bolesnik 2	3,47	bolesnik 12	10,63	bolesnik 22	6,01
bolesnik 3	3,14	bolesnik 13	12,53	bolesnik 23	1,93
bolesnik 4	10,61	bolesnik 14	7,47	bolesnik 24	3,32
bolesnik 5	7,13	bolesnik 15	4,34	bolesnik 25	0,79
bolesnik 6	11,11	bolesnik 16	4,39	bolesnik 26	4,82
bolesnik 7	4,16	bolesnik 17	14,67	bolesnik 27	3,88
bolesnik 8	7,82	bolesnik 18	3,08	bolesnik 28	1,80
bolesnik 9	7,42	bolesnik 19	0,72	bolesnik 29	2,28
bolesnik 10	9,75	bolesnik 20	2,50	bolesnik 30	4,85

U radu Budakove i sar. prikazana je HPLC metoda sa UV detekcijom na 220 nm za određivanje lamotrigina, primidona, fenobarbitona, fenitoina, karbamazepina i dva aktivna metabolita 2-fenil-2-etil-malonamida i 10,11-dihidro-10,11-epoksikarbamazepina. Uzorci su pripremljeni tečno-tečnom ekstrakcijom. Mobilna faza koju čine voda:acetonitril:metanol:trietilamin u odnosu 72:23:5:0,1 imala je pH 7,0. Opseg linearnosti bio je od 0,5-25 mg/L. Koeficijenti varijacije u toku dana i iz dana u dan su bili manji od 10 %. Analiza je trajala 10 min. (7).

Contin M. i saradnici određivali su lamotrigin i druge antiepileptike novije generacije HPLC-UV tehnikom pri talasnoj dužini od 220 nm. Uzorak je pripreman deproteinizacijom sa acetonitrilom. Korišćena je kisela mobilna faza pH- 4,5. Vreme trajanja analize je 19 min. Linearnost njihove metode je u opsegu 2- 40 mg/L, a limit detekcije 2 mg/L (8).

Bompadre S. i saradnici koristili su HPLC-UV tehniku na 260 nm za detekciju lamotrigina u punoj krvi tj. hemolizatu (krv:voda-1:1) koji je pripreman čvrsto-tečnom ekstrakcijom. Korišćena je mobilna faza koja sadrži fosfatni pufer (pH vrednosti 4,5) i acetonitril u odnosu 60:40. Metoda je bila linearna u rasponu koncentracija od 0,2-20 mg/L. Koeficijenti varijacije u toku jednog dana i iz dana u dan bili su od 1,8% do 6,7 %. Analiza je trajala 10 min. (9).

Lamotrigin se može izolovati iz male zapremine uzorka seruma (50 µL) alkalnom ekstrakcijom sa dietiletom i odrediti HPLC-UV metodom na 225 nm uz mobilnu fazu koja sadrži acetonitril-voda sa 0,2% fosforne kiseline i 0,3% trietilamina (pH 2,7) (84:16 v/v). Retenciono vreme lamotrigina je oko 6 minuta, a srednji prinos ekstrakcije oko 80%. Limit kvantifikacije ove metode bio je 0,1 mg/L (10).

Greiner-Sosanko E. i saradnici su za detekciju lamotrigina u serumu pacijenata koristili tečnu i gasnu hromatografiju. U primenjenoj tečnoj hromatografiji detekcija leka je vršena pomoću UV detektora na 270 nm. Pokazano je da su primenjene tehnike pouzdane i jednostavne za rutinsko određivanje koncentracije lamotrigina u serumu pacijenata (11).

Reverzno fazna tečna hromatografija sa UV detekcijom korišćena je u radu Patil KM. i saradnika za određivanje nivoa lamotrigina i drugih antiepileptika u serumu pacijenata.

Uzorak je pripreman sa acetonitrilom uz dodatak pentobarbitona kao internog standarda (IS). Mobilna faza je smeša fosfatnog pufera, metanola, acetonitrila i acetona (55:22:12:11), čija je pH 7,0. Talasna dužina na kojoj su detektovali lamotrigin je 210 nm. Minimalna koncentracija leka koju su odredili bila je 0,2 mg/L (12).

U radu Angelis-Stoforidis P. i saradnika koji su određivali koncentraciju lamotrigina u serumu pacijenata

HPLC-UV tehnikom, priprema uzorka vršena je precipitacijom proteina acetonitrilom. Talasna dužina za detekciju lamotrigina je 306 nm. Linernost je postignuta u opsegu koncentracija 1-20 mg/L ($R^2= 0,998$). Limit detekcije je 0,6mg/L, a limit kvantifikacije 1 mg/L, za razliku od naše metode gde su dobijene znatno niže vrednosti 0,09 i 0,32 mg/L, a pri linearnom opsegu 0,5-10 mg/L ($R^2= 0,999$). Koeficijenti varijacije za merenja u toku jednog dana i iz dana u dan su manji od 6%. U našoj metodi korišćena je ista talasna dužina za detekciju leka. Pokazalo se da je na toj talasnoj dužini interferencija koja potiče iz uzorka svedena na minimum i bez prethodne deproteinizacije (13).

Prednost naše metode za određivanje lamotrigina u odnosu na prethodno navedene ogleda se u jednostavnijoj i bržoj preanalitičkoj pripremi uzoraka sa prinosom ekstrakcije od 85,54%. Većom talasnom dužinom detekcije (306 nm), bez deproteinizacije uzorka, eliminišu se interferencije proteina i drugih biomolekula koje na toj talasnoj dužini ne apsorbuju UV svetlost. Lamotrigin je lek sa baznim osobinama, tako da se pokazalo da se pri pH vrednosti naše mobilne faze od 7,5 dobija dobar hromatografski odgovor sa RT-3,8 ± 0,2 min. Ukupno trajanje analize od samo 6 min. je od velike važnosti, posebno u urgentnim slučajevima kada je pravovremeno izdavanje pouzdanih rezultata bitno za

zdravlje bolesnika. Sa druge strane, ova metoda se pokazala kao ekonomična u odnosu na druge skuplje i složenije tehnike, kao što su tečna i gasna hromatografija sa masenom detekcijom. Ovo je naročito važno ako se određuje koncentracija leka u krvi kada je poznato da nema prisustva drugih lekova koji bi mogli interferirati. Limit detekcije i kvantifikacije od 0,09 mg/L i 0,32 mg/L čini našu metodu za određivanje lamotrigina osjetljivijom u odnosu na prethodno opisane. Linearnost kalibracione krive postignuta je u rasponu od 0,5-10 mg/L, što obuhvata opseg terapijskih koncentracija. Dobijeni koeficijent varijacije u toku dana i iz dana u dan manji je od 8% što takođe ukazuje na dobru ponovljivost i stabilnost metode pri datim uslovima.

U Odeljenju za toksikološku hemiju gotovo svakodnevno se određuju koncentracije lamotrigina u serumu pacijenata. U Tabeli 4. može se videti da su nivoi leka u velikom rasponu koncentracija, ali uglavnom u opsegu terapijskih vrednosti 4-11 mg/L. Najniža koncentracija linearnosti od 0,5 mg/L uzeta je zbog praćenja nivoa leka kod bolesnika kojima se ukida terapija, pa se mogu očekivati značajno niske koncentracije. Kod bolesnika 21 koncentracija leka je niža od minimalne koncentracije linearnosti, ali je iznad vrednosti LOD (>0,09 mg/L). U slučajevima gde je koncen-

tracija leka iznad 10 mg/L (bolesnici 6, 13 i 17), uzorci su razblaženi dva puta kako bi se dobio dobar hromatografski odgovor iz opsega linearnosti. Na takav način dobijeni su sigurni rezultati uzevši u obzir i dvostruko razblaženje.

ZAKLJUČAK

Upotreba lamotrigina u terapiji epilepsije bilo kao monoterapija ili deo politerapije zahteva praćenje nivoa leka u krvi. Zbog toga je razvijanje precizne i osjetljive metode za terapijski monitoring lamotrigina od velike važnosti. Opisana HPLC-UV metoda je zbog svoje jednostavne i brze pripreme uzorka, trajanja analize od samo 6 minuta i visoke talasne dužine na kojoj se vrši detekcija, a kojom se eliminišu interferencije iz uzorka, pouzdana za određivanje lamotrigina u serumu pacijenata u svakodnevnoj praksi. Kako se savremenim imunohemijskim metodama ne mogu odrediti antiepileptici nove generacije kojoj pripada lamotrigin, primenjena HPLC-UV tehnika je posebno značajna za njegovu detekciju u kliničkim laboratorijama.

Abstract

The most common method used for the detection of the new generation of antiepileptic drugs to which belongs lamotrigine is liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV). Precise and reliable HPLC-UV method was used for the determination of lamotrigine in serum of patients. Samples were prepared by solid-liquid extraction with the addition of the alkaline solution of concentrated ammonia, and then subjected to analysis on HPLC. Lamotrigine was detected at a wavelength of 306 nm. High wavelength eliminates interferences which originate from the sample. The linearity of the calibration curve is in the range from 0.5 to 10 mg / L, which covers therapeutic concentrations. Intra and inter day coefficients of variation are less than 8%.

LITERATURA

- (1) Vajda FJ, Dodd S, Hogroan D, Lamotrigine in epilepsy, pregnancy and psychiatry-a drug for all seasons, J Clin Neurosci, 2012. S0967-5868(12)
- (2) Eisenberg E, Lurie Y, Braker C, Daoud D, Ishay A, Lamotrigine reduces painful diabetic neuropathy. A randomized, controlled study, Neurology, 2001, 57 (3): 505-509
- (3) Braga MF, Aronidau-Anderjaska V, Post RM, Li H, Lamotrigine reduces spontaneous and evoked GABAA receptor-mediated synaptic transmission in the basolateral amygdala: implications for its effects in seizure and affective disorders, Neuropharmacology, 2002; 42(4): 522-9
- (4) Shiah IS, Yatham LN, Gau YC, Baker GB, Effect of lamotrigine on plasma GABA levels in healthy humans, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003;27(3):419-23
- (5) Jickells S, Negrusz A, Clarke's analytical forensic toxicology, Pharmaceutical Press, London-Chicago, 2008.
- (6) Vuksanović J, Određivanje lamotrigina u serumu HPLC metodom, specijalistički rad, 2001, Beograd
- (7) Budakova L, Brozmanova H, Grundmann M, Fischer J, Simultaneous determination of antiepileptic drugs and their two active metabolites by HPLC, J Sp Sci, 2008;31(1):1-8
- (8) Contin M, Mohamed S, Candela C, Albani F, Riva R, Baruzzi A, Simultaneous HPLC-UV analysis of rufinamide, zonisamide, lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in deproteinized plasma of patients with epilepsy, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010;878(3-4):461-5
- (9) Bompadre S, Tagliabracci A, Battino M, Giorgetti R, Determination of lamotrigine in whole blood with on line solid phase extraction, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008;863(1):177-80
- (10) Cheng CL, Chou CH, Hu OY, Determination of lamotrigine in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005;817(2):199-206
- (11) Greiner-Sosanko E, Giannoutsos S, Lower DR, Virji MA, Krasowski MD, Drug monitoring: simultaneous analysis of lamotrigine, oxcarbazepine, 10-hydroxycarbazepine, and zonisamide by HPLC-UV and a rapid GC method using a nitrogen-phosphorus detector for levetiracetam. J Chromatogr Sci. 2007;45(9):616-22.
- (12) Patil KM, Bodhankar SL, Simultaneous determination of lamotrigine, phenobarbitone, carbamazepine and phenytoin in human serum by high-performance liquid chromatography, J Pharm Biomed Anal. 2005;39(1-2):181-6.
- (13) Angelis-Stoforidis P, Morgan DJ, O'Brien TJ, Vajda FJ, Determination of lamotrigine in human plasma by high-performance liquid chromatography, J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1999;727(1-2):113-8