

ORIGINAL

Optimización de una técnica de cromatografía líquida de alta eficacia para la determinación de lamotrigina en plasma humano

N. Rivas^a, A. Zarzuelo^b y F.G. López^c

^aFarmacocinética, PKPD, Salamanca, España

^bUSALA, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

^cUniversidad de Salamanca, Salamanca, España

Recibido el 6 de abril de 2009; aceptado el 15 de septiembre de 2009

Disponible en Internet el 6 de febrero de 2010

PALABRAS CLAVE

Lamotrigina;
Cromatografía líquida
de alta eficacia con
detector ultravioleta;
Estudios de validación

KEYWORDS

Lamotrigine;
HPLC-UV;
Validation studies

Resumen

Objetivo: Optimizar el método bioanalítico HPLC-UV empleado hasta el momento en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca, para la determinación de los niveles plasmáticos de la lamotrigina (LTG).

Material y métodos: La técnica analítica de HPLC-UV desarrollada y utilizada hasta el momento demostró ser lineal, exacta y precisa, siendo apta para su empleo en la monitorización rutinaria de la LTG. Sin embargo, presentaba un prolongado tiempo para el análisis de las muestras, por lo que se optó por una mejora en la misma. Dicha mejora consistió en el empleo de una columna cromatográfica alternativa a la usada hasta el momento. Para ello se sustituyó la habitualmente empleada (Kromasil-100C18–5 μm–15*0,4 cm por la LiChroCART-RP18e–3 μm–5,5*0,4 cm) realizando en ambos casos una extracción líquido-líquido y siguiendo el mismo protocolo de extracción de muestra.

Resultados: Ambas validaciones demostraron que los dos tipos de columnas son válidos para la monitorización rutinaria de la LTG.

Conclusión: La disminución en el tiempo de retención, junto con el menor límite de cuantificación y los mejores parámetros de precisión y exactitud obtenidos con la columna LiChorCART, sugieren a esta como una candidata ideal para la práctica clínica debido al gran número de determinaciones que pueden realizarse en un menor tiempo y la mayor precisión en la cuantificación de la LTG.

© 2009 SEFH. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Optimisation of a high-efficiency liquid chromatography technique for measuring lamotrigine in human plasma

Abstract

Objective: The purpose of this study was to optimise the HPLC-UV bio-analytical method currently used by the Salamanca University Clinical Hospital for determining lamotrigine plasma levels.

Correo electrónico: nuria.m.rivas@gmail.com (N. Rivas).

Material and methods: The developed HPLC-UV analytic technique currently in use was shown to be linear, exact and precise, and suitable for use in routine monitoring of lamotrigine levels. The drawback of this method has always been the time required for analysing samples, so our aim was to improve on that elapsed time. That improvement involved using a different chromatographic column from the one used up until now. We replaced the column that was normally used (Kromasil-100C18-5 μm -15*0.4 cm with a LiChroCART-RP18e-3 μm -5.5*0.4 cm); in both cases, a liquid-liquid extraction was performed and the same sample extraction protocol was followed.

Results: Both validation methods showed that the two column types are valid for routine lamotrigine monitoring.

Conclusion: The decrease in retention time, in addition to a lower quantification limit and better precision and accuracy parameters obtained with the LiChroCART column, suggest that this unit is ideal for use in clinical practice because it enables a large number of determinations to be performed in less time and the greater precision of LTG measurements.

© 2009 SEFH. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La lamotrigina (LTG) (3,5-diamino-(6[2,3-diclorofenil]-1,2,4-triazina) es un agente antiepiléptico cuya estructura química no está relacionada con otros antiepilépticos habitualmente utilizados.

Presenta una actividad farmacológica similar a la de otros fármacos antiepilépticos como la fenitoína o la carbamazepina^{1,2}. Es un medicamento efectivo como coadyuvante para el tratamiento de crisis parciales simples y crisis tónico-clónicas, con generalizaciones secundarias resistentes a otros tratamientos farmacológicos³.

La monitorización rutinaria de los fármacos antiepilépticos es una práctica habitual en los servicios de farmacia hospitalaria debido a la gran ayuda que esto supone para los pacientes, ya que el óptimo control de las concentraciones plasmáticas es una herramienta clave para el buen control de las crisis, ayudándonos del mismo modo a ampliar el conocimiento de las diferentes interacciones que se producen cuando se administra junto con otros fármacos antiepilépticos, especialmente inductores e inhibidores enzimáticos⁴⁻⁷.

Desde el punto de vista farmacocinético es de gran utilidad, puesto que, si bien existe un margen terapéutico no muy bien definido⁸⁻¹⁰ ya que este es muy amplio, el mayor conocimiento del fármaco nos permitiría un mejor ajuste del mismo. Además, este tipo de determinaciones pueden ser aplicadas para estudios poblacionales¹¹, siendo esta, junto con una optimización y reducción en el tiempo de las determinaciones plasmáticas de la LTG, algunas de las razones por las que en el presente trabajo hemos estudiado el efecto de la longitud de la columna y el tamaño de partícula en el tiempo de análisis, el límite de cuantificación y la exactitud y precisión de las dos técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia con detector ultravioleta (HPLC-UV) utilizando el margen de concentraciones de 0,5-20,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (margen de concentraciones plasmáticas habituales en humanos).

Materiales y métodos

Material

La LTG BW430C78 (3,5-diamino-(6[2,3-diclorofenil]-1,2,4-triazina) y su estándar interno BW725C78 ([3,5-diamino-6-][2-metoxifenil]-1,2,4-triazina estándar interno (SI) fueron proporcionados por Wellcome Research Laboratories (Cardiff, Reino Unido).

Los reactivos usados (dihidrógeno fosfato potásico, hidróxido sódico, trietilamina) de grado analítico y metanol de grado HPLC fueron adquiridos a través de Merck (MerckK-GaA, Darmstadt, Alemania). El agua purificada se obtuvo en el laboratorio con un sistema de purificación de agua Milli-Q. El plasma humano se obtuvo del banco de sangre del Hospital Clínico Universitario de Salamanca (HUSAL).

Preparación de estándares

En primer lugar, se prepara una solución madre de LTG en metanol de concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Esta solución es diluida después en plasma para preparar la solución de trabajo, de concentración de 20,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A partir de esta solución de trabajo los estándares que se preparan son de concentraciones de 15,0; 10,0; 8,0; 6,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,15 y 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LTG.

En el caso del SI se prepara una solución madre de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en metanol, a partir de la cual se prepara la solución de trabajo de concentración de 20,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Cromatógrafo

La técnica analítica utilizada fue la HPLC. El sistema cromatográfico empleado fue el sistema HP1050 con inyector automático y detector UV de Waters 486 y el software Clarity[®].

La separación cromatográfica se realizó con dos tipos de columnas: Kromasil 100 C18 5 μm 15*0,4 y LiChroCART RP18e 5,5* 0,4 μm (TeknoKroma).

Las condiciones cromatográficas fueron: la fase móvil consistió en una mezcla de 0,1 M KH_2PO_4 , trietilamina y metanol (62:3:35% v/v) con un pH = 6,2. La fase móvil se preparaba diariamente, desgasificándola y filtrándola con un filtro de membrana de 0,45 μm .

El proceso cromatográfico se llevaba a cabo a temperatura ambiente con un flujo de trabajo de 1 ml/min y con luz UV a una longitud de onda de 206 nm.

Procedimiento de extracción de LTG/SI

El proceso de extracción consistió en una extracción líquido-líquido. A 50 μl de SI + 50 μl de 2 M NaOH se añadían a 500 μl de muestra; la mezcla se agitaba durante 30 s y posteriormente se añadían 2 ml de acetato de etilo como solvente orgánico. Tras 30 s de agitación en vortex, se recogía la fase orgánica y se centrifugaba durante 10 min a 3.500 rpm. Después, y como paso final, se evaporaba en atmósfera de N_2 y se reconstituía con 100 μl de fase móvil inyectándose en el cromatógrafo un volumen de 50 μl ¹².

Validación de la técnica bioanalítica

Se ha estudiado la selectividad, exactitud y precisión siguiendo las premisas de la FDA¹³.

Para estudiar la selectividad de la técnica se analizaron 6 blancos de plasma de orígenes distintos. El estudio de linealidad se realizó preparando 5 curvas de calibración con el margen de concentraciones comprendido entre 0,5 y 20,0 $\mu\text{g/ml}$ (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 15,0 y 20,0 $\mu\text{g/ml}$). Con los datos obtenidos calculamos el valor de r, el coeficiente de variación del factor relativo de respuesta y la desviación de la media del factor respuesta para cada concentración.

A partir de los datos del estudio de linealidad determinamos la exactitud de la técnica como porcentaje de recuperación de la cantidad de LTG añadida a cada muestra.

En cuanto a la precisión, se estudió tanto la repetibilidad como la reproducibilidad de ambos métodos. Para estudiar la repetibilidad, o precisión intradía, la misma persona preparó y analizó cinco réplicas de las concentraciones altas, medias y bajas, el mismo día y con los mismos reactivos. Para el estudio de reproducibilidad, o precisión interdía, el mismo analista preparó igualmente cinco réplicas de las concentraciones altas, medias y bajas de la concentración de LTG, pero en este caso en diferentes días y

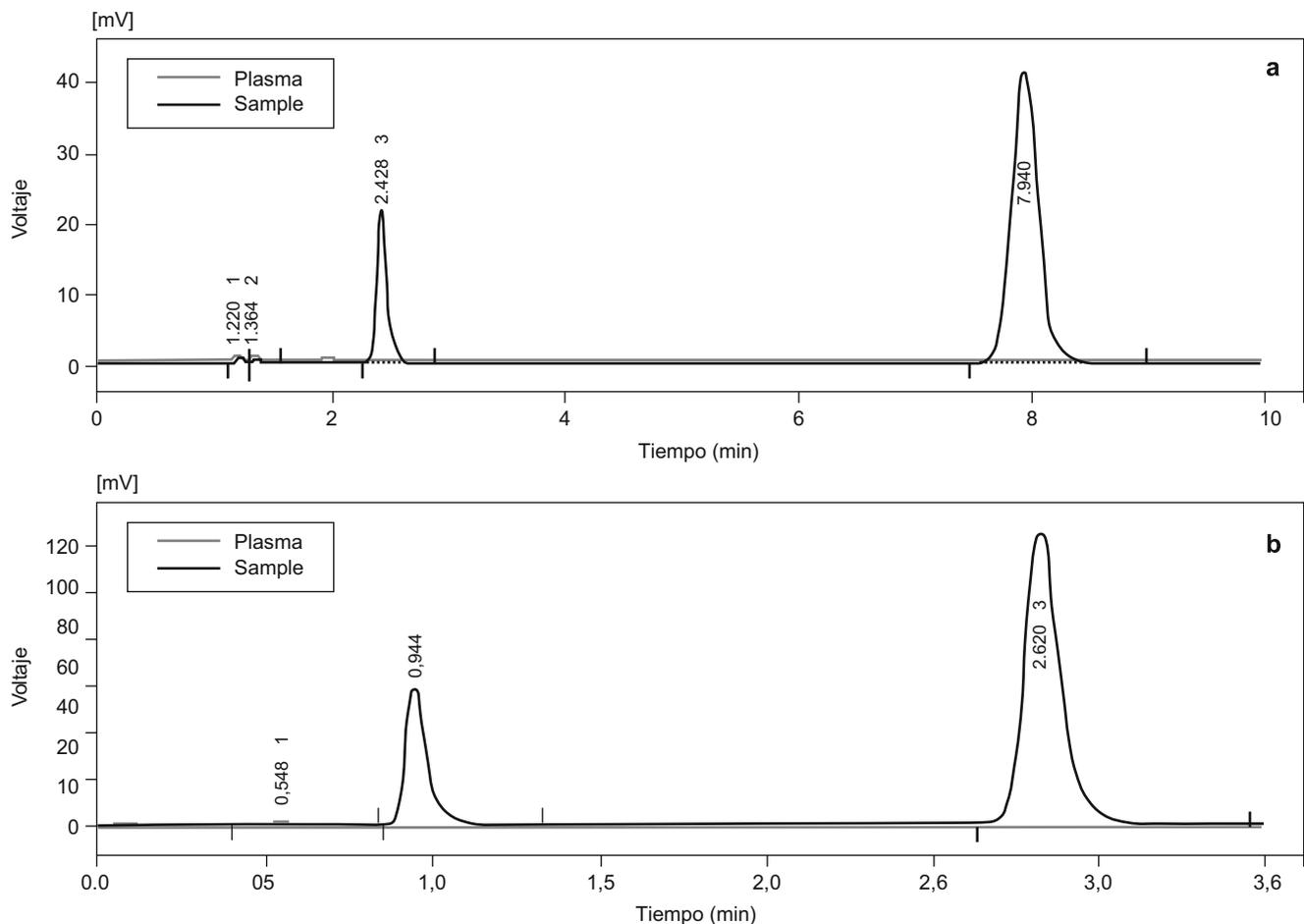


Figura 1 Cromatograma de un blanco y una muestra identificando tanto la LTG como el SI. A) Kromasil. B) LiChroCART.

Tabla 1 Resultados del estudio de validación con la columna Kromasil para las concentraciones de margen estudiadas (0,5–20 µg/ml)

	Media ± SD	CV %
r	0,998	
Fr (factor respuesta)	0,55 ± 0,03	6,07
Exactitud (% recuperación)	101,83 ± 7,39	7,25
Repetibilidad (área LTG/área SI)		
0,5 µg/ml	0,27 ± 0,01	1,99
6,0 µg/ml	3,35 ± 0,21	6,40
20,0 µg/ml	11,31 ± 0,15	1,29
Reproducibilidad (área LTG/área SI)		
0,5 µg/ml	0,29 ± 0,01	4,55
6,0 µg/ml	3,55 ± 0,27	7,68
20,0 µg/ml	11,49 ± 0,27	2,31
Límite de cuantificación	0,25 µg/ml	

Tabla 2 Resultados del estudio de validación realizados con la columna LiChroCART para el margen de concentraciones estudiadas (0,5–20 µg/ml)

	Media ± SD	CV %
r	0,999	
fr (factor respuesta)	0,55 ± 0,03	6,07
Exactitud (% recuperación)	100,13 ± 3,42	3,41
Repetibilidad (área LTG/área SI)		
0,5 µg/ml	0,33 ± 0,01	3,90
6,0 µg/ml	3,60 ± 0,05	1,31
20,0 µg/ml	11,82 ± 0,36	3,05
Reproducibilidad (área LTG/área SI)		
0,5 µg/ml	0,32 ± 0,02	6,64
6,0 µg/ml	3,49 ± 0,14	4,12
20,0 µg/ml	11,56 ± 0,37	3,20
Límite de cuantificación	0,1 µg/ml	

con diferentes reactivos. En ambos casos se calcularon los CV del área (área LTG/área SI) en los 5 análisis.

Adicionalmente, determinamos los límites de cuantificación siguiendo el método de Lang and Bolton¹⁴. El margen de concentraciones entre 0,5 y 0,1 µg/ml (0,5; 0,25; 0,15 y 0,1 µg/ml) se prepararon por triplicado.

Resultados

Para estudiar la selectividad de la técnica se analizaron 6 blancos de plasma de orígenes distintos observándose que, tal y como se representa en la figura 1, a los tiempos de retención de la LTG y de su SI no aparecen picos fantasmas de componentes del plasma. De la misma manera se realizaron diferentes estudios con plasmas de pacientes en politerapia con distintos fármacos antiepilépticos observándose el mismo efecto, la no interferencia en

ninguno de los casos. De la misma manera se encontró una excelente separación entre el pico de LTG y su SI, y entre este último y otros componentes de las muestras plasmáticas. Los tiempos de retención de la LTG fueron de 7,94 y 2,62 y para su SI 2,43 y 0,95 min para las columnas Kromasil y LiChroCART, respectivamente.

Los resultados de los límites de cuantificación fueron 0,25 y 0,1 µg/ml para las columnas Kromasil y LiChroCART, respectivamente.

La validación de ambas técnicas ha proporcionado unos resultados que pueden verse en las tablas 1 y 2 del presente documento.

Discusión

El estudio de la optimización de la técnica analítica de HPLC-UV para la determinación de las concentraciones plasmáticas de LTG ha demostrado que es un método adecuado para la monitorización farmacocinética, dentro de los límites del rango terapéutico de (3–14 µg/ml), que es lo habitualmente encontrado en la práctica clínica.

La selección de ambas columnas se ha realizado en función de las similitudes en sus características fisicoquímicas, siendo la principal diferencia entre ambas el menor tamaño de partícula y longitud. El hecho de realizar la comparativa de ambas columnas se ha debido al intento por mejorar la técnica bioanalítica, permitiendo de este modo aumentar, como ya se ha mencionado anteriormente, tanto el número como la precisión de las determinaciones realizadas.

El poder contar con un método bioanalítico exacto, preciso, repetible, reproducible y rápido permite establecer un sistema de monitorización rutinaria en la práctica clínica, así como la posibilidad de realizar estudios farmacocinéticos para determinar y estudiar de esta manera tanto el comportamiento del fármaco en sí como las posibles interacciones con otros fármacos.

A partir de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la complejidad del tratamiento de las muestras, una vez que el método ha sido validado, se ha tomado como criterio de un buen tratamiento de los datos una variabilidad máxima del área del SI del 15% respecto al valor de la media de los datos obtenidos en la validación. Todas las muestras que sobrepasen este valor deberán ser repetidas ya que es posible que se haya cometido algún error durante la preparación de las muestras. Tales errores se reflejan así en el área del SI.

Por lo tanto el estudio nos permite concluir que la columna LiChroCART sería la candidata mas adecuada para la monitorización rutinaria de la LTG en la práctica clínica debido a la disminución en el tiempo de análisis y la adecuabilidad de la técnica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Leach MJ, Mardem CM, Miller AA. Pharmacological studies on lamotrigina, a novel potential antiepileptic drug: II. Neuro-

- chemical studies on the mechanism action. *Epilepsia*. 1986;27:490–7.
2. Millar AA, Wheatley P, Sawyer DA, Baxter MG, Roth B. Pharmacological studies on lamotrigine, a novel potential antiepileptic drug: I. Anticonvulsant profile in mice and rats. *Epilepsia*. 1986;27:483–9.
 3. Marson AG, Kadir ZA, Chadwick DW. New antiepileptic drugs: a systematic review of their efficacy and tolerability. *BMJ*. 1996;313:1169–74.
 4. Jawad S, Yuen WC, Peck AW, Hamilton MJ, Oxley JR, Richens A. Lamotrigine: single-dose pharmacokinetics and initial 1 week experience in refractory epilepsy. *Epilepsy Res*. 1987;194–201.
 5. Cohen AF, Land GS, Breimer DD, Yuen WC, Winton C, Peck AW. Lamotrigine, a new anticonvulsant: pharmacokinetics in normal humans. *Clin Pharmacol Ther*. 1987;42:535–41.
 6. Peck AW. Clinical pharmacology of lamotrigine. *Epilepsia*. 1991;32:9–12.
 7. Matar KM, Nicholls PJ, Bawazir SA, Al-Hassan MI, Tekle A. A rapid liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 1998;17:525–31.
 8. Castel-Branco MM, Almeida AM, Falção AC, Macedo TA, Caramona MM, López FG. Lamotrigine analysis in blood and brain by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr, B Biomed. Sci. Appl*. 2001;755:119–27.
 9. Morris RG, Black AB, Harris AL, Batty AB, Sallustio BC. Lamotrigine and therapeutic drug monitoring: retrospective survey following the introduction of a routine service. *Br J Clin Pharmacol*. 1998;46:547–51.
 10. Hart AP, Mazarr-Proo S, Blackwell W, Dasgupta A. A rapid cost-effective high-performance liquid chromatographic (HPLC) assay of serum lamotrigine after liquid-liquid extraction and using HPLC-UV conditions routinely used for analysis of barbiturates. *Ther Drug Monit*. 1997;19:431–5.
 11. Alkawi A. Downbeat nystagmus as a result of lamotrigine toxicity. *Epilepsy Research*. 2005;63:85–8.
 12. 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;665–8.
 13. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (US). URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>.
 14. Lang JR, Bolton S. A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry. *J Pharm Biomed Anal*. 1991;9:361–75.