

Mise au point et validation d'une méthode de dosage de la lamotrigine par chromatographie liquide à haute performance et application clinique

Development and validation of a new HPLC method for determination of Lamotrigine and clinical application

Nadia Jebabli, Emna Gaïes, Hanen EL jebari, Rim Charfi, Mohamed Lakhall, Anis Klouz, Sameh Trabelsi, Issam Salouage

Centre National de pharmacovigilance

RÉSUMÉ

Prérequis : La lamotrigine est un antiépileptique, la forte variabilité interindividuelle et l'absence d'une bonne corrélation entre la posologie et la concentration plasmatique, rendent nécessaire l'adaptation des protocoles thérapeutiques en fonction des concentrations plasmatiques.

But : Mettre au point et de valider une nouvelle méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance (CLHP) de la lamotrigine dans le plasma.

Méthodes : Nous décrivons une technique de dosage de la lamotrigine par CLHP mise au point dans notre laboratoire et utilisable en routine, en recourant à une détection UV. Nous décrivons également les conditions opératoires optimisées de cette technique de dosage, dont la température et le débit d'élution, la composition et le pH de la phase mobile et les modalités d'extraction.

Résultats : Après déprotéinisation et extraction liquide/liquide la séparation chromatographique est faite sur une colonne C18 et détection UV-Visible (longueur d'onde:210nm). La phase mobile est composée d'un mélange composé de tampon dihydrogenophosphate à 0,1 M et d'acétonitrile, 75/25 (v/v). Le barbital sodique est utilisé comme étalon interne (EI). L'étalonnage est linéaire entre 2 à 50 µg/mL ($r = 0,99$). Les limites de détection et de quantification sont respectivement de 0,07 et 0,21 µg/mL, la répétabilité et la reproductibilité de respectivement 13,37 à 16 % et 15,68 à 16,63 % à trois concentrations différentes. Le taux de recouvrement varie de 37,22 % à 68,25 % à trois concentrations différentes. Dans ces conditions, le temps d'analyse est de 10 minutes.

Conclusions : Nous avons mis au point une technique de dosage simple, spécifique, facile à mettre en œuvre et rapide. Elle permet donc des dosages en routine de la lamotrigine dans le plasma chez les patients traités par cet antiépileptique et nécessitant un suivi thérapeutique pour un éventuel ajustement de dose.

Mots-clés

Lamotrigine – CLHP – traitement

SUMMARY

Background: Lamotrigine is an effective anticonvulsant drug used in the treatment of epilepsy. It has a narrow therapeutic range, a large inter and intra-individual pharmacokinetic variability and some concentration-dependent side effects.

Aim: The aim of this study was to develop and validate a new method for lamotrigine quantitation in plasma using HPLC with UV/visible detection.

Methods: A rapid HPLC-UV method was developed for the determination of lamotrigine in plasma. All solvents used were HPLC grade.

Results: After liquid-liquid extraction, chromatographic separation was achieved using an RP 18 (250 mm) column. The mobile phase was composed of acetonitrile and 0.1 M potassium dihydrogenophosphate (25/75) (v/v). Barbital sodium was used as internal standard. This technique was linear over the 2 µg/mL to 50 µg/mL range ($r = 0.99$). Detection and quantification limits were 0.07 µg/mL and 0.21 µg/mL, respectively. Within-day coefficient of variation (13.37 to 16 %) and day-to-day coefficients of variation (15.68 to 16.63 %) at three different concentrations. Under these conditions, each analysis required no longer than 10 min. We finally evaluated the plasma concentrations of lamotrigine in Tunisian patients treated with this drug.

Conclusion: The results found are similar to those previously described and the developed method is repeatable and reproducible. It can be used for clinical applications.

Key-words

Lamotrigine-HPLC-Therapeutic drug monitoring

La lamotrigine est un antiépileptique de seconde génération ayant un effet stabilisateur de la membrane neuronale par modification des flux ioniques au niveau des canaux sodiques voltages dépendants [1]. Du fait de la grande variabilité inter et intra individuelle, la détermination de sa concentration plasmatique individuelle peut être considérée comme le meilleur moyen permettant d'assurer une bonne efficacité du traitement tout en évitant le risque de toxicité. La lamotrigine est administrée généralement en polythérapie exposant aux risques de survenue d'effets indésirables par interactions médicamenteuses. Ce qui justifie pleinement son suivi thérapeutique pharmacologique. De nombreuses méthodes de dosage de la lamotrigine par chromatographie liquide haute performance (CLHP) dans les milieux biologiques ont été décrites. Cependant, elles font le plus souvent intervenir plusieurs étapes d'extraction [2-8]. La méthode CLHP que nous proposons met en œuvre la technique de polarité inversée avec un étalonnage interne et une détection UV.

L'objectif de ce travail est de mettre au point et de valider une méthode de dosage de la lamotrigine dans le plasma par HPLC (détection UV) qui soit simple, sensible et rapide afin de pouvoir l'appliquer chez des malades épileptiques traités par ce médicament.

MÉTHODES

Ce travail a été réalisé au Service de Pharmacologie Clinique du Centre National de Pharmacovigilance.

Appareillage

Le système de CLHP utilisé dans notre travail est composé d'une Pompe Prostar 240, d'un détecteur UV-visible Prostar 325 LC, d'un four Prostar 510 et d'un auto-sampler Prostar 410. Les chromatogrammes sont enregistrés et les calculs de concentration effectués à l'aide d'un intégrateur D-2500. Tous ces matériaux sont commercialisés par la Société Varian®.

L'acquisition et l'intégration des résultats ont été réalisées à l'aide du logiciel Galaxie version 1.9.3.2 Pentium 4HT.

Solvants et réactifs

Tous les réactifs et les solvants utilisés dans notre travail sont de qualités CLHP. Nous avons utilisé, de l'acétonitrile, du méthanol, de l'acide acétique, du dichlorométhane, du diéthylether et de l'eau bidistillée. Le plasma de référence provient du laboratoire d'hématologie de l'Hôpital Charles-Nicolle de Tunis.

Etape chromatographique

La phase mobile est composée de tampon phosphate à 25 mmol/L, et d'acétonitrile (55/45 : V/V). Elle subit une filtration type Büchner sur filtre 0,45 µm fourni par Millipore. La phase mobile est dégazée et le débit est de 0,8 mL/min. Le volume d'injection est de 50 µL et la durée totale de l'injection est de 10 min. Une fois l'identification des composés réalisée, leur quantification est faite par la mesure de l'aire des pics obtenus qui est proportionnelle à la quantité du produit analysé. Le calcul de la concentration de la lamotrigine dans l'échantillon se fait simplement grâce à l'ajout de l'EI (le barbital sodique).

Préparation des solutions

La solution mère de lamotrigine à 50 µg/mL est préparée par dissolution de 5 mg de la lamotrigine dans 100 mL de méthanol. La solution mère d'EI (le barbital-sodique) à 1mg/mL est préparée par dissolution de 5 mg de barbital sodique dans 5 mL de méthanol. Ces solutions sont conservées à -80°C. Les solutions de travail sont préparées extemporanément par dilution de la lamotrigine au demi et au 5ème dans du méthanol et du barbital sodique au 10ème.

Gamme d'étalonnage

Elle est réalisée à partir de la solution de travail extemporanée à 25 µg/mL de la lamotrigine. Les points de gamme obtenus sont les suivants : 2, 5, 10, 20, 30, 50 µg/mL.

Préparation des échantillons

Le protocole de déprotéinisation/extraction s'applique à la gamme d'étalonnage et au plasma de patients. À une prise d'essai de 200 µL de plasma introduite dans un tube à fond conique, sont ajoutés et mélangés 100 µL d'étalon interne et 200 µL d'Acide acétique (10%); les tubes sont ensuite centrifugés à 4000 tours/min pendant 10 min. Le surnageant est transféré dans un autre tube dans lequel sont ajoutés 6 mL d'un mélange de diéthylether et dichlorométhane, (64%/36%) après centrifugation à 3000 tours/min, la phase organique est évaporée sous flux d'azote à 40 °C. Le résidu est repris par 100 µL de phase mobile et le volume injecté est de 50 µL.

Validation

Pour la validation de la méthode de dosage proposée, l'étude de la corrélation et des liaisons entre deux variables quantitatives est réalisée au moyen du coefficient de corrélation calculé à l'aide du logiciel Biostat Pythagore 2. Le calcul du coefficient de variation (CV) permet d'évaluer les paramètres de validation.

Dans notre travail, nous nous sommes fixés un CV inférieur à 20%.

Tableau 1 : Résultats de l'évaluation de la précision, des recouvrements et des intervalles de confiance de la méthode de dosage.

| Analyse | Concentration (µg/mL) | Moyenne des concentrations ± écart type (µg/mL, n = 6) | CV (%) | moyenne de recouvrement (%) |
|------------|-----------------------|---|--------|-----------------------------|
| Intra-jour | 2 | 1,72 ± 0,23 | 13,37 | 68,25 |
| | 10 | 8,58 ± 1,32 | 15,3 | 52,31 |
| | 40 | 43,18 ± 6,78 | 16 | 73,58 |
| Inter-jour | 2 | 1,77 ± 0,23 | 16,01 | 48,57 |
| | 10 | 9,27 ± 0,65 | 15,68 | 37,22 |
| | 40 | 37,26 ± 5,21 | 16,63 | 65,61 |

Patients et prélèvements :

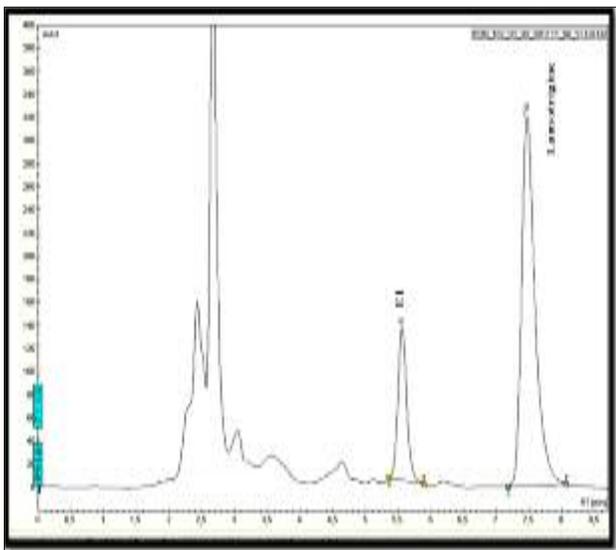
Nous avons effectué une étude chez un groupe de patients Tunisiens traités par la lamotrigine seule ou en association avec d'autres antiépileptiques. Les dosages plasmatiques des concentrations résiduelles (C0) ont été faits par HPLC à détection UV. L'intervalle thérapeutique choisi est de 3-14 µg/mL. Les échantillons de sang veineux (3 à 5 mL) ont été prélevés sur tubes héparinés, après une centrifugation durant cinq minutes à 4000 tours par minute, on a récupéré le plasma. Tous les prélèvements étaient accompagnés d'une fiche de renseignement qui comprenait les informations suivantes : Le nom et prénom du patient, âge, poids, le nom du médecin traitant, posologie, service, Hôpital d'accueil et médicaments associées.

RÉSULTATS

Mise au point

Nous avons étudié les meilleures conditions chromatographiques, à savoir : la colonne, longueur d'onde, température d'élution et composition de la phase mobile. Nous avons choisi une colonne RP-18, 250 mm. Nous avons sélectionné la longueur d'onde de 210 nm dont le choix a été établi en fonction du spectre d'absorbance de la lamotrigine. Nous avons ensuite procédé à la sélection du débit ainsi que de la température. Une température de 60 °C a permis d'obtenir le temps de rétention optimal. Le débit d'élution choisi est de 0,8 mL car il a permis d'obtenir un temps de rétention adéquat et une pression correcte au niveau de la pompe. Afin de pouvoir quantifier la lamotrigine, nous avons ajouté à l'échantillon 15 µL de l'étalon interne, le barbital-sodique à la concentration de 100 µg/mL. Dans ces conditions, les temps de rétention de la lamotrigine et du barbital-sodique sont respectivement de 7 min et 5,5 min quand la phase mobile est constituée 75% Tampon dihydrogenophosphate de potassium 0,1M et de 25% acétonitrile. (figure 1)

Figure 1 : – Tracé chromatographique représentant le pic de la lamotrigine et de son EI après extraction.



Validation de la méthode de dosage

Nous avons procédé à la validation de la méthode selon les recommandations des BONNES Pratiques de Laboratoires. Nous avons déterminé la fidélité, la linéarité et les limites de détection (LD) et de quantification (LQ). L'analyse des résultats inter-journaliers a montré un CV égale à 16,1 % définissant la reproductibilité. Le CV de répétabilité calculé à partir de six échantillons, était de 14,89 % (tableau1). Dans l'étude de la linéarité, comportant huit concentrations différentes variant de 2 à 50 µg/mL, le coefficient de corrélation était de 0,999. La limite de quantification a été déterminée par la formule $LQ = (10 \times \delta) / b$, où δ est l'écart type et b est la pente de la droite de régression de la linéarité. Cette LQ est de 0,21 µg/mL. La limite de détection (LD), déterminée par la formule $LD = (3,3 \times \delta) / b$, est de 0,07 µg/mL.

Application

Nous avons collecté 22 prélèvements provenant de 22 patients. 13 patients sont suivis pour trouble bipolaire, 6 pour épilepsie et chez 3 patients la pathologie n'est pas précisée. La médiane d'âge est de 32 ans [7,5 - 60 ans] avec un sexe ratio (M/F) de 0,6. La moyenne de poids est de 68 kg [26 - 90kg]. La moyenne de la dose est 3mg/kg/j [0,5 – 6 mg/kg/j]. La moyenne de C0 est 4,49 µg/mL [0–18,64 µg/mL]. Chez onze patients, la C0 était infrathérapeutique, 10 patients avaient une C0 dans l'intervalle thérapeutique et un patient avait une C0 supratherapeutique. L'acide valroïque est associé chez 4 patients (moyenne des C0 de 5 µg/mL) et le phénobarbital chez un patient (C0 = 1,45 µg/mL). Trois patients ont développé des effets indésirables (moyenne C0 à 3,24 µg/mL) à type de sécheresse de la bouche, confusion, agressivité et tremblements.

DISCUSSION

Nous proposons une méthode de dosage de la lamotrigine dans le plasma, à la fois simple, sensible et rapide. Pour la valider nous avons suivi les recommandations des Bonnes Pratiques de Laboratoire. Pour mettre au point notre nouvelle technique de dosage de la lamotrigine par HPLC, nous avons commencé par le choix de la colonne et de l'étalon interne qui permet de quantifier l'échantillon à doser. Puis nous avons optimisé les différentes conditions de travail : la température d'élution, la longueur d'onde, le débit d'élution et la phase mobile. Dans notre travail nous avons utilisé une colonne RP18 apolaire de longueur 250 mm et de diamètre interne de 4,6 µm. Notre phase mobile est formée par du tampon dihydrogenophosphate de potassium 0,1 M et d'acétonitrile (C2H3N). Tous ces solvants sont polaires. Nous avons donc choisi une phase mobile polaire et une phase stationnaire apolaire permettant l'élution de la lamotrigine et de son étalon interne. En se référant à la bibliographie, l'étalon interne le plus utilisé est le Butalbitol BW725C78 [2,3]. Dans notre travail nous avons testés plusieurs molécules : Butobarbital, Butalbarbital, Amobarbital et Barbital-sodique. Ce dernier, présente une structure chimique proche du Butalbitol et sur le plan chromatographique il présente un pic bien défini séparé de la lamotrigine et un temps de rétention acceptable permettant un temps d'analyse court.

La validation de notre technique de dosage a montré que notre technique est linéaire dans l'intervalle de 2 à 50 µg/mL avec un excellent coefficient de corrélation ($r = 0,999$). Ce résultat est

comparable à ceux rapportés dans la littérature dont la technique était linéaire pour une gamme de concentration allant de 0,1 à 47 µg/mL [4-6]. La limite de détection et la limite de quantification étaient respectivement 0,068 µg/mL et 0,209 µg/mL dans un volume de plasma précis. Ce résultat est également cohérent avec les données de la littérature, où la limite de détection varie de 0,01 à 0,2 µg/mL [4,5] et la limite de quantification de 0,1 à 0,58 µg/mL [1, 7-8]. L'étude de précision nous a donné un coefficient de variation (CV%) de la répétabilité de 14,89 % et CV% de la reproductibilité de 16,10 % ce qui affirme que notre technique est précise.

L'évaluation des concentrations résiduelles (C0) de la lamotrigine chez un groupe de patients Tunisiens traités par ce médicament seul ou en association avec d'autres antiépileptiques a montré que la moitié de nos patients avaient une C0 infrathérapeutique, avec une tendance à la majoration ou à la diminution de la concentration suite à l'association d'un inhibiteur ou d'un inducteur enzymatique. Ceci

justifie pleinement le recours au suivi thérapeutique pharmacologique de ce médicament pour aider le clinicien à adapter la posologie et éviter d'étiqueter le patient comme résistant à la lamotrigine. Ce travail nécessite d'inclure un nombre plus important de patients afin de vérifier la corrélation entre concentration / effets indésirable et concentration / efficacité.

CONCLUSION

La méthode analytique que nous proposons pour la quantification plasmatique de la lamotrigine présente de nombreux avantages. C'est une technique simple, spécifique, facile à mettre en œuvre et rapide. Elle permet donc des dosages en routine de la lamotrigine dans le plasma chez les patients traités par cet antiépileptique et nécessitant un suivi thérapeutique pour un éventuel ajustement de dose.

Références

1. [La Roche S.M, Helmers S.L. The new antiepileptic drugs: Clinical applications. JAMA 2004; 291: 615-20.
2. Fraser A D, MacNeil W, Isner A F, Camfield PR. Lamotrigine analysis in serum by high performance liquid chromatography. Therapeutic drug monitoring 1995; 17:174-78.
3. Rivas N, Zarzuelo A, López FG. Optimization of a high-efficiency liquid chromatography technique for measuring lamotrigine in human plasma. Farmacia Hospitalaria 2010; 34:85-9.
4. Emami J, Ghassami N, Ahmadi F. Development and validation of a new HPLC method for determination of lamotrigine and related compounds in tablet formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2006; 40: 999-1005.
5. Cheng CL, Chou CH, Hu OY. Determination of lamotrigine in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B 2005; 817:199-206
6. Barbosa N R, Madio AF. Validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in human plasma. Journal of Chromatography B BIOMEDICAL Sciences and applications 2000; 741: 289-93.
7. Greiner-Sosanko E, Lower DR, Virji MA, Krasowski MD. Simultaneous determination of lamotrigine, zonisamide, and carbamazepine in human plasma by high-performance liquid chromatography. Biomed Chromatography 2007; 21: 225-228.
8. Torra M, Rodamilans M, Arroyo S, Corbella J. Optimized procedure for lamotrigine analysis in serum by high-performance liquid chromatography without interferences from other frequently coadministered anticonvulsants. Therapeutic Drug Monitoring 2000 ; 22:621-5.