



VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO POR HPLC-DAD PARA LA DETERMINACIÓN DE LAMOTRIGINA EN PLASMA Y SALIVA

Valls, Jerónimo¹; Castelli, Gabriela¹; Farfán, Silvia¹; Cubilla, Marisa²; Estrella, Sofía¹; Lucero, Patricia¹.

¹Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba (CEPROCOR). Pabellón CEPROCOR (X5164) Santa María de Punilla. Córdoba.

²Núcleo Multidisciplinario de Investigación en Salud Pediátrica de Precisión (NUMISAP). Unidad Asociada CONICET- Hospital de Niños de la Santísima Trinidad Córdoba.

jvalls@mi.unc.edu.ar; patricia.a.lucero@gmail.com

INTRODUCCIÓN

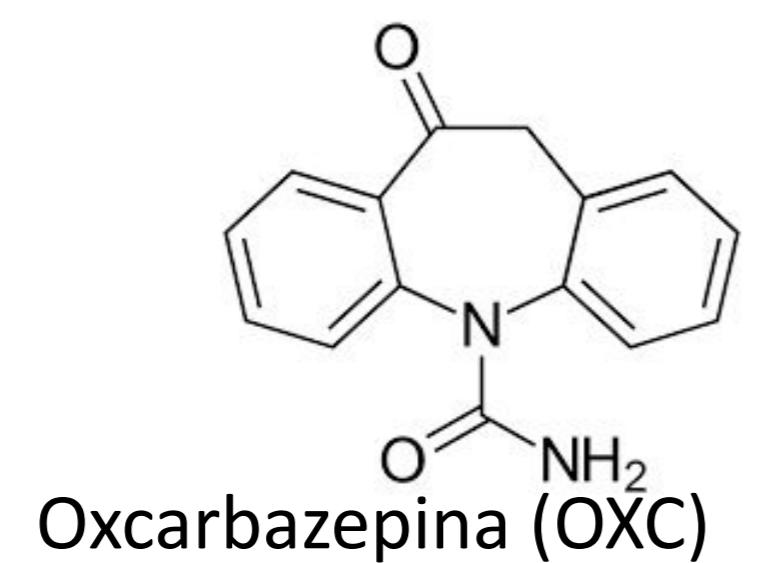
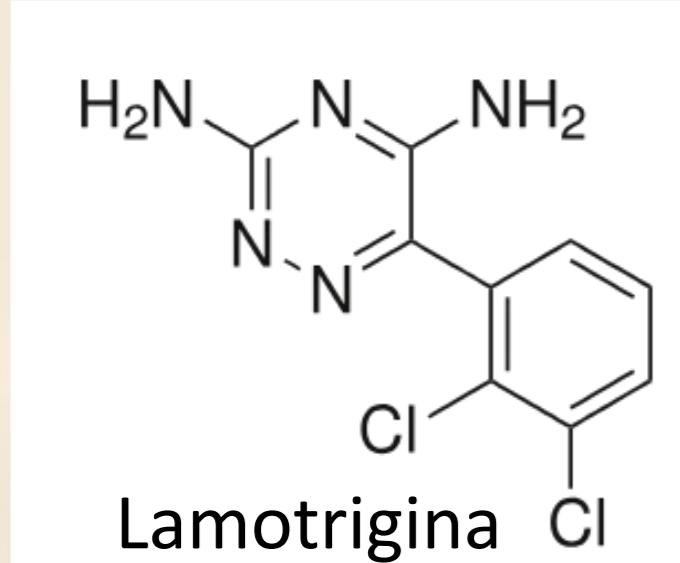
La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más frecuentes a nivel mundial y su tratamiento se basa principalmente en fármacos antiepilépticos. La monitorización terapéutica de fármacos (MTF) permite optimizar la dosificación, reducir efectos adversos y garantizar eficacia clínica. La lamotrigina (LTG), empleada en epilepsia y trastorno bipolar, no presenta un rango terapéutico definido, ya que su acción depende de factores individuales. Se ha sugerido un intervalo de concentraciones plasmáticas de entre 3,0 – 14,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que concentraciones superiores a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se asocian a toxicidad. El plasma es la matriz de referencia para el MTF, aunque la saliva surge como alternativa no invasiva, ya que refleja adecuadamente las concentraciones de LTG libre en sangre.

OBJETIVO

Este trabajo tuvo por objetivo validar un método bioanalítico por HPLC-DAD para la determinación de LTG en plasma y saliva humana como herramienta para el MTF.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Muestras blanco de plasma y saliva de voluntarios.
- Estándar LTG - Estándar oxcarbazepina (estándar interno).
- HPLC-DAD marca Shimadzu Nexera XR.



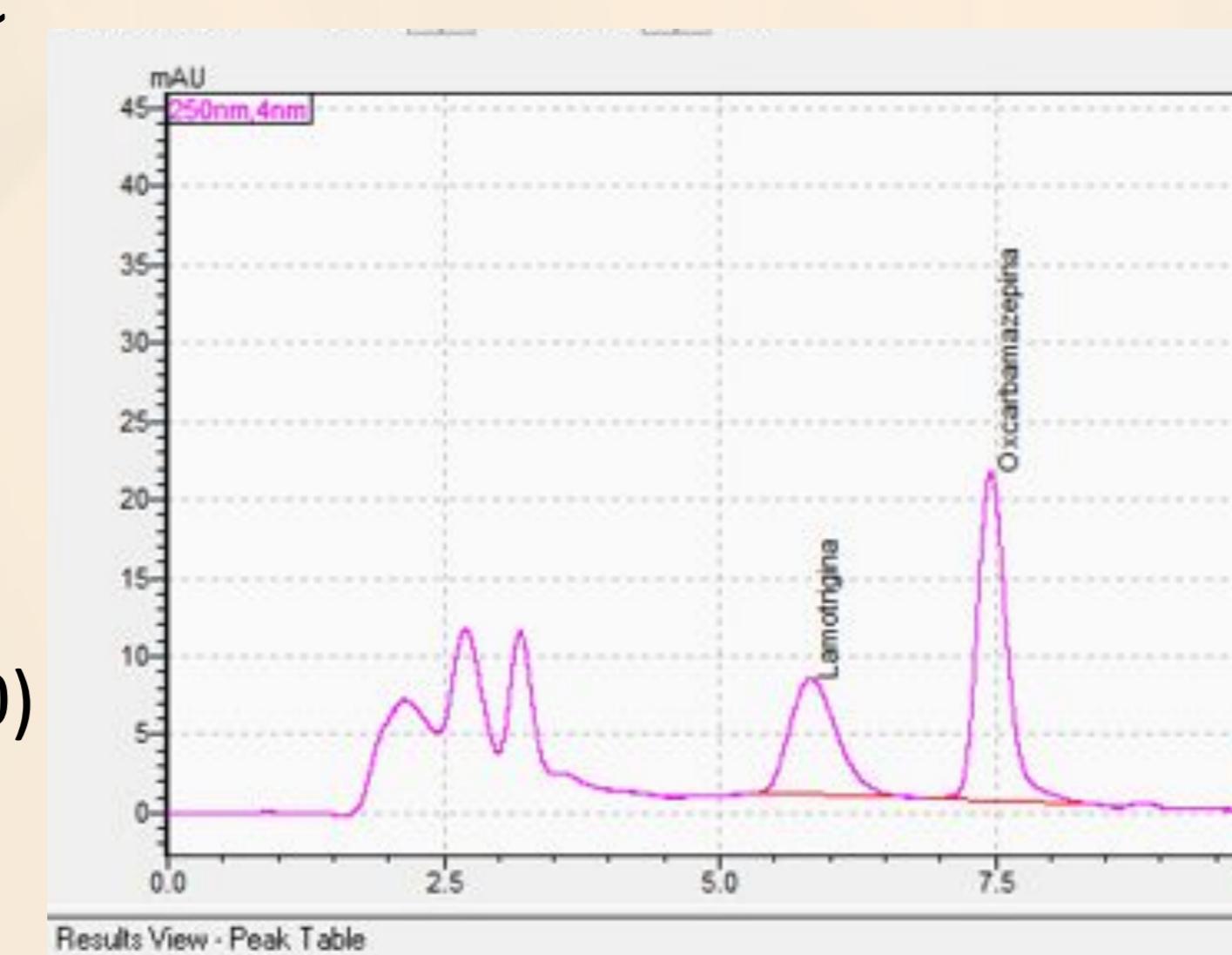
RESULTADOS

- SELECTIVIDAD:** No interfirieron en la determinación de LTG otros antiepilépticos como carbamazepina, ácido valproico y fenitoína ya que poseen tiempos de retención diferentes a los de LTG y la OXC.
- SENSIBILIDAD:** 6 muestras blanco de plasma y saliva. No se observaron señales interferentes en los tiempos de retención de los analitos (Figura 1).
- LINEALIDAD:** 3 curvas con 8 estándares de calibración. El método fue lineal entre 1,5 y 18,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en plasma y saliva (Figura 2).
- RECUPERACIÓN:** Nivel de fortificación: 2 mg L^{-1} (plasma) y 1 mg L^{-1} (saliva). Los resultados fueron superiores al 85 % en ambas matrices.
- PRECISIÓN INTRAENSAYO ($n = 5$) E INTERENSAYO ($(n = 5) \times 3$):** 4 niveles (en el límite de cuantificación, nivel bajo, nivel medio y nivel alto). Se obtuvieron CV inferiores al 15 %.
- EXACTITUD INTRAENSAYO ($n = 5$) E INTERENSAYO ($8N = 5 \times 3$):** 4 niveles (en el límite de cuantificación, nivel bajo, nivel medio y nivel alto). Los sesgos con respecto a la concentración nominal resultaron en todos los casos inferiores al 15 %.
- ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES DE ESTÁNDARES:** Las soluciones de LTG y OXC fueron estables conservadas a -20 °C durante un lapso de 5 meses.
- ESTABILIDAD DE MUESTRAS ENRIQUECIDAS:** Las muestras de plasma enriquecido fueron estables durante 28 días conservadas a -20 °C, en cambio las muestras de saliva enriquecida se conservaron solo 7 días.

MÉTODO ANALÍTICO

Tratamiento de la muestra

- 1- 200 μl de muestra (plasma/saliva) + 50 μl de NaOH 2M + 100 μl de solución 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de OXC.
- 2- Extraer: 2 mL de acetato de etilo (x2)
- 3- Centrifugar: 10 min a 8 000 rpm a 15 °C
- 4- Evaporar: flujo de nitrógeno a 40 °C
- 5- Reconstituir en 2 mL de fase móvil.



Condiciones Cromatográficas

- Columna: Shimpack C18 GIST 100 x 2,1 mm, 2 μm
- Temperatura de columna: 40 °C.
- Fase móvil: agua:acetonitrilo (70:30)
- Flujo variable: (0,15 a 0,25) mL/min
- $\lambda = 250$ nm
- Volumen de inyección: 5 μl

VALIDACIÓN DEL MÉTODO BIOANALÍTICO

Se evaluaron los siguientes los parámetros:

Sensibilidad - Especificidad - Recuperación

Linealidad - Precisión - Exactitud- Estabilidad



FARMA LB 019 Validación del método bioanalítico:

Guía ICH M10 (EMA/CHMP/ICH/660315/2022)

Disposición ANMAT 4844/2005

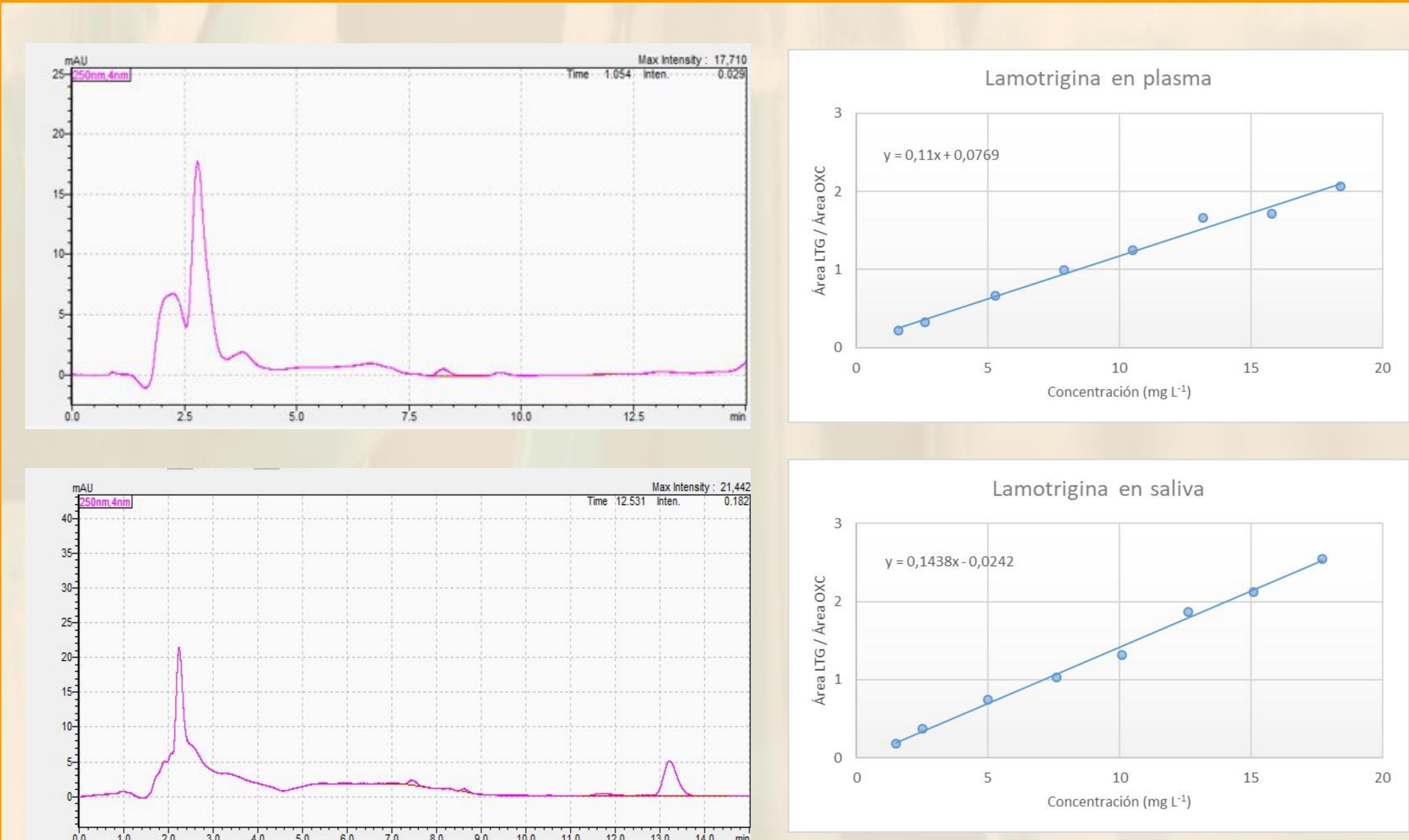


Figura 1. Cromatogramas de muestras blanco de plasma (imagen superior) y saliva (imagen inferior).

Figura 2. Curvas de calibración de LTG en plasma y saliva

CONCLUSIÓN

La inclusión de la saliva como matriz alternativa resultó ser una herramienta potencialmente útil para el MTF. Se obtuvo un método sensible, reproducible y apto para ser aplicado en la práctica clínica y en contextos de investigación toxicológica.