

ANTİEPİLEPTİK İLAÇ SERUM KONSANTRASYONLARININ ÖLÇÜMÜNDE HPLC VE TÜRBİDİMETRİK YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Aysel KIYICI¹, Mehmet ŞENEŞ²

¹Dr. Faruk Sükan Doğum ve Çocuk Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, KONYA

²Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, ANKARA

ÖZET

Amaç: Antiepileptik ilaçların serumdaki konsantrasyonlarının ölçümünde yıllardan beri farklı yöntemler kullanılmış olup halen pek çok laboratuvarında değişik yöntemlerle ölçüm yapılmaktadır. Biz çalışmamızda serumda antiepileptik ilaç düzeyi ölçümünde turbidimetrik yöntemi HPLC yöntemi ile karşılaştırarak, turbidimetrik yöntemin performansını değerlendirmeyi amaçladık **Gereç ve Yöntem:** S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi nöroloji ve pediatri kliniklerinde takipte olan epilepsi hastalarının ilaç düzeyi kontrolü için verdikleri kan örneklerinden her iki yöntemle ölçüm yapıldı. Çalışma aynı hastanenin biyokimya laboratuvarında gerçekleştirildi. Karbamazepin için 35, fenitoin için 31 ve fenobarbital için ise 30 örnek çalışmaya alındı. **Bulgular:** Çalıştığımız ilaçlara ait çalışma içi %CV değerleri düşük ve yüksek düzeydeki serum havuzlarında HPLC yönteminde karbamazepin, fenitoin ve fenobarbital için sırasıyla şöyleydi : % 1.57 ve % 3.62; % 2.15 ve % 4.14; % 1.53 ve % 4.34. Turbidimetrik yöntemde ise aynı serum havuzlarında karbamazepin için % 2.66 ve % 7.03; fenitoin için %1.98 ve %2.04 ve fenobarbital için ise % 3.31 ve % 5.24 bulundu. Ayrıca yöntemin HPLC tekniği ile korelasyonu oldukça iyiydi (Karbamazepin için $r = 0.95$, fenitoin için $r = 0.97$ ve fenobarbital için $r = 0.86$). Yaptığımız geri kazanım çalışması sonuçlarına göre ise turbidimetrik yöntemin karbamazepin, fenitoin ve fenobarbital için % R değerlerini sırasıyla % 80.4, % 88 ve % 86.8 olarak bulduk. HPLC yönteminde ise ortalama % R değerleri karbamazepin, fenitoin ve fenobarbital için sırasıyla % 105, % 107 ve % 110 olarak bulundu. **Sonuç:** HPLC tekniği serumda antiepileptik ilaç konsantrasyonu ölçümünde referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Turbidimetrik yöntemin performansı HPLC ile kıyaslandığında daha zayıftır, ancak daha hızlı ve ucuz olması nedeniyle ülkemizde hala tercih edilmektedir.

Anahtar kelimeler: Antiepileptik ilaç düzeyi, HPLC, turbidimetri

Selçuk Tıp Der 2006: 22: 91-95

SUMMARY

The comparison of HPLC and turbidimetric methods in the measurement of serum antiepileptic drug concentrations

Aim: Many different methods have been used for detection of antiepileptic drug concentrations for many years in clinical chemistry laboratories. In our study we aimed to evaluate the performance of turbidimetry as a method for detection of serum antiepileptic drug concentrations by comparing it with HPLC technique. **Material and Method:** Measurements were performed in both methods

Haberleşme Adresi : Dr. Aysel KIYICI

S.Ü. Meram Tıp Fak. Biyokimya ABD, KONYA

ayselkiyici@gmail.com

Geliş Tarihi: 17.01.2006

Yayına Kabul Tarihi: 18.04.2006

on the blood samples of the epileptic patients who were in follow up in neurology and pediatrics clinics of Ministry of Health Ankara Education and Research Hospital. This study was carried on laboratory of biochemistry of the same hospital. 35 samples for carbamazepine, 31 for phenytoin and 30 for phenobarbital were taken into this study. **Results:** Within run CV values for HPLC technique in measurement of sera were as follows for each drug: Carbamazepine 1.57% and 3.62%; phenytoin 2.15% and 4.14%; and phenobarbital 1.53% and 4.34%. They were found in turbidimetric method as follows: Carbamazepine 2.66% and 7.03%; phenytoin 1.98% and 2.04% and phenobarbital 3.3% and 5.24%. There was a significant correlation between turbidimetric method and HPLC technique (for carbamazepine $r= 0.95$, phenytoin $r= 0.97$ and phenobarbital $r= 0.86$). The recovery rates for each drug in turbidimetry were satisfactory (carbamazepine $R\%= 80.4\%$, phenytoin 88% and phenobarbital 86.8%). They were as follows in HPLC technique: $R\%= 105\%$, 107% , 110% . **Conclusion:** HPLC technique is accepted as a reference method for detection of serum antiepileptic drug concentrations. The performance of turbidimetric method is weak when compared with HPLC technique. But because of the cost effectiveness and the short turn around time, turbidimetry was preferred in our country.

Key words: Antiepileptic drug level, HPLC, turbidimetry

Karbamazepin, fenitoin ve fenobarbital, epilepside değişik tipteki nöbetlerin tedavisinde sıkça kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçların serumdaki konsantrasyonlarının rutin monitorizasyonu; terapötik düzeylerin sağlanması, toksik konsantrasyonlardan kaçınılması ve aynı zamanda uyumun kontrolü açısından son derece önemlidir (1,2).

Bu ilaçların serumdaki konsantrasyonlarının ölçümünde yıllardan beri pek çok farklı yöntem kullanılmış olup halen değişik laboratuvarlar tarafından değişik yöntemlerle ölçüm yapılmaktadır. Yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC), floresan immunoassay (FIA), floresan polarizasyon immunoassay (FPIA), gaz kromatografi (GC), enzimle çoğaltma immünoassay tekniği (EMIT) ve turbidimetrik yöntemler bunlardandır (1).

Biz çalışmamızda serumda antiepileptik ilaç konsantrasyonu ölçümünde turbidimetrik yöntemi HPLC yöntemi ile karşılaştırarak, turbidimetrik yöntemin performansını değerlendirmeyi amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi nöroloji ve pediatri kliniklerinde takipte olan epilepsi hastalarının ilaç düzeyi kontrolü için verdikleri kan örneklerinden her iki yöntemle ölçüm yapıldı. Çalışma aynı hastanenin biyokimya laboratuvarında gerçekleştirildi. Hasta-

lar çalışma konusunda bilgilendirildi ve izinleri alındı. Karbamazepin için 35, fenitoin için 31 ve fenobarbital için ise 30 örnek çalışmaya alındı. Bu laboratuvarında rutinde kullanılan yöntem olan HPLC tekniği ile hasta örneklerinin ölçümleri yapıldıktan sonra turbidimetrik yöntemle ölçümleri yapılmaya kadar örnekler $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de Eppendorf tüplerde saklandı.

Turbidimetrik yöntemle ölçüm, Beckman Synchron LX 20 sistemlerinde orijinal Beckman kitleri ile gerçekleştirildi. Yöntemin prensibi ilaç konsantrasyonunun partikülle hızlandırılmış turbidimetrik inhibisyon immunoassay ile ölçümüne dayanmaktadır. Ölçümde partikül bağlı ilaçlar özgül antikorlarıyla bağlanarak ışık saçılmasına neden olan çözünmeyen agregatlar oluştururlar. Hasta örneğindeki ilaç ile partikül bağlı ilaç antikor bağlanma bölgeleri için yarışarak çözünmeyen agregatların oluşumunu inhibe eder. Partikül agregasyonunun miktarı ve hızı örnekteki ilaç konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Ölçümler üretici firma tarafından önerilen programlar doğrultusunda yapıldı. Test aralıkları kit prospektüslerinde karbamazepin için $4-12\text{ }\mu\text{g/mL}$, fenitoin için $10-20\text{ }\mu\text{g/mL}$ ve fenobarbital için $15-40\text{ }\mu\text{g/mL}$ şeklinde verilmişti.

HPLC analizi ise HPLC-Chromsystems sistemindeki yüksek çözünürlüklü kolon kullanılarak yapıldı. Ölçümler üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. HPLC tekni-

Tablo 1. Türbidimetrik Yöntemle Serumda Karbamazepin, Fenitoin ve Fenobarbital Ölçümünde Çalışma İçi Presizyon Değerleri

Örnek	Karbamazepin		Fenitoin		Fenobarbital	
	Ortalama ± STD	%CV	Ortalama ± STD	%CV	Ortalama ± STD	%CV
Düzey 1	4.86±0.13	2.66	9.2±0.18	1.98	13.36±0.44	3.31
Düzey 2	9.57±0.67	7.03	15.84±0.32	2.04	24.14±1.26	5.24

ğinin performansını değerlendirmek için presizyon ve geri kazanım çalışmaları yapıldı. İki farklı düzeyde hazırlanan serum havuzunda presizyon çalışması yapıldı. Çalışma içi %CV değerleri düşük ve yüksek düzey için sırasıyla şu şekilde bulundu: Karbamazepin için %1.57 ve %3.62; fenitoin için %2.15 ve %4.14; ve fenobarbital için %1.53 ve %4.34. Düşük düzeydeki serum havuzuna değişik oranlarda yüksek düzeydeki serum havuzundan eklenerek her bir ilaç için HPLC yönteminin ortalama geri kazanım (%R) değerleri hesaplandı. Bu değerler karbamazepin, fenitoin ve fenobarbital için sırasıyla %105, %107 ve %110 olarak bulundu.

Türbidimetrik yöntemin performansını değerlendirmek için presizyon ve geri kazanım çalışmaları yapıldı. Her iki yöntemle elde edilen ölçüm sonuçlarının karşılaştırılmasında korelasyon ve regresyon analizi yöntemi kullanıldı. Bu amaçla Microsoft Excel (Microsoft Corporation) ve SPSS for Windows versiyon 10,0 (Real State Corporation, İngiltere) programları kullanıldı.

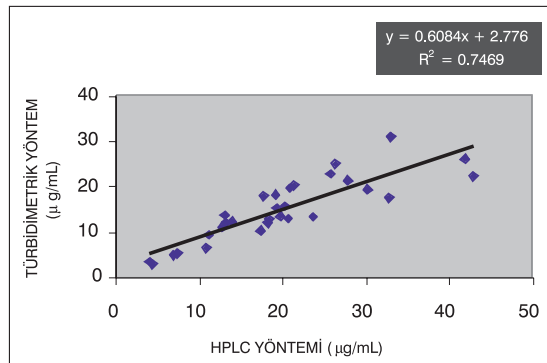
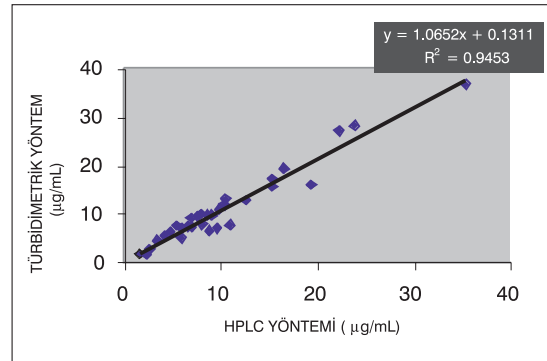
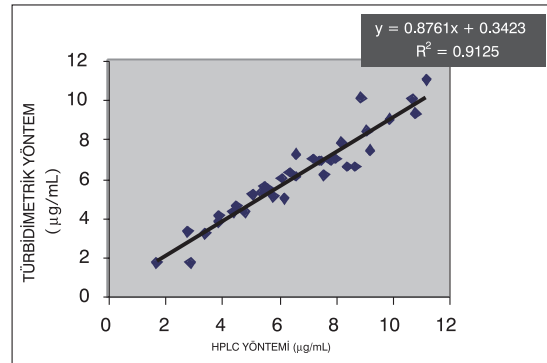
BULGULAR

Presizyon

Türbidimetrik yönetime ait presizyon çalışmaları için HPLC yönteminin presizyon çalışmasında kullanılan iki farklı düzeydeki serum havuzları kullanıldı. Çalışma içi %CV değerleri karbamazepin, fenitoin ve fenobarbital için Tablo 1' deki gibi bulundu.

Korelasyon ve Regresyon Analizi

Korelasyon çalışmasında karbamazepin için 35, fenitoin için 31 ve fenobarbital için ise 30 örnek hem HPLC hem de türbidimetrik yöntemle analiz edildi. Karbamazepin için korelas-



yon katsayısı 0.95, slope 0.87 ve intercept 0.34 µg/mL (Şekil 1), fenitoin için korelasyon katsayısı 0.97, slope 1.06 ve intercept 0.13 µg/mL (Şekil 2), fenobarbital için ise korelasyon katsayısı 0.86, slope 0.60 ve intercept 2.77 µg/mL (Şekil 3) olarak bulunmuştur.

Geri Kazanım Çalışması

Düşük düzeydeki serum havuzuna değişik oranlarda yüksek düzeydeki serum havuzundan eklenerek her bir ilaç için türbidimetrik yöntemin ortalama %R değerleri hesaplandı. Bu değerler karbamazepin, fenitoin ve fenobarbital için sırasıyla %80.4, %88 ve %86.8 olarak bulundu.

TARTIŞMA

Türbidimetri, antiepileptik ilaç konsantrasyonunu analizinde pek çok laboratuvarında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle ölçüm için üretilmiş pek çok ticari kit mevcuttur (3,4).

Serumda antiepileptik ilaç düzeyi monitörizasyonunda HPLC tekniğini kullanan değişik sistemler mevcuttur. Lamotrijin, fenobarbital, karbamazepin ve fenitoin için kan düzeylerinin ölçümünün yapıldığı bir çalışmada basit bir ters fazlı HPLC sistemi oluşturulmuş ve yöntemin performansı diğer HPLC sistemleri ile uyumlu bulunmuş (5). Bu yöntemle oxkarbazepin ve ana metabolitlerinin de diğer ilaçlarla birlikte saptanmasının mümkün olması kombine ilaç kullanan epilepsi hastalarının takibinde de bir avantaj sağlamaktadır(6).

Çok katımlı dış kalite kontrol sonuçlarının değerlendirildiği bir çalışmada serum ilaç düzeyi ölçümü için kullanılan analitik sistemlerin performansı karşılaştırılmıştır. Floresans polarizasyon immunoassay (FPIA) tekniği ile ölçüm yapan sistemlerde negatif bias problemi gözlenirken kromatografik ve türbidimetrik yöntemlere ait sonuçlar tatmin edici bulunmuştur (7). FPIA ve HPLC tekniklerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada her iki yöntemle serum karbamazepin konsantrasyonları ölçülmüş ve FPIA ile HPLC' den daha yüksek sonuçlar bulunmuştur. Ancak HPLC ile ölçülen karbamazepin ve onun ana metaboliti olan 10,11-epoksid türevinin konsantrasyon-

ları toplamı ile FPIA' da bulunan karbamazepin konsantrasyonu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (8).

Serumda antiepileptik ilaç konsantrasyonu ölçümü için bugüne kadar pek çok immunolojik yöntem kullanılmıştır. Basit bir türbidimetrik lateks aglutinasyon inhibisyon immunoassay ile kan primidon düzeyi ölçümü gerçekleştirilmiş, sonuçların farklı enzim immunoassay teknikleri ile korelasyonu oldukça iyi bulunmuş (9). Basit bir aglutinasyon inhibisyon immunoassay analizi ile dahi böyle tatmin edici sonuçlar elde edilmesi türbidimetrik inhibisyon immunoassay prensibi ile çalışan ticari kit üretimini hızlandırmıştır. Daha önceki çalışmalarda serumda antiepileptik ilaç konsantrasyonu ölçümünde türbidimetrik yöntemin performansını değerlendirmek amacıyla floresans polarizasyon ya da kemiluminesans yöntemlerle korelasyonuna bakılmıştır (10-12).

Biz de karbamazepin, fenitoin ve fenobarbital için serum düzeylerinin saptanmasında Beckman Synchron LX 20 otoanalizöründe aynı sistem için geliştirilmiş türbidimetrik yöntemin performansını referans yöntem kabul edilen HPLC tekniği ile karşılaştırdık.

Çalıştığımız ilaçlara ait çalışma içi %CV değerleri düşük ve yüksek düzeydeki serum havuzlarında sırasıyla şu şekildedir: Karbamazepin için %2.66 ve %7.03; fenitoin için %1.98 ve %2.04 ve fenobarbital için ise %3.31 ve %5.24. Ayrıca yöntemin HPLC tekniği ile korelasyonu da oldukça iyiydi (Karbamazepin için $r = 0.95$, fenitoin için $r = 0.97$ ve fenobarbital için $r = 0.86$). Korelasyonun bu ilaç için daha zayıf olmasının kalibrasyon hatasından kaynaklanıp kaynaklanmadığını ortaya koymak için türbidimetrik yöntemle ait yüksek konsantrasyonlu kalibratörlerin HPLC tekniği ile ölçümünü yaptığımızda sorunun kalibratörlere bağlı olmadığını anladık. Ancak hem yüksek düzeydeki kontrol örneklerindeki hem de presizyon çalışması için kullandığımız yüksek düzeyli serum havuzundaki ölçümlerde benzer olarak anlamlı bir düşüklük göze çarpıyordu. Bu değerler bize yöntemin lineari-

sinde bir problem olduğunu düşündürmektedir. Yaptığımız geri kazanım çalışması sonuçlarına göre ise türbidimetrik yöntemin karbamazepin, fenitoin ve fenobarbital için % R değerlerini sırasıyla %80.4, %88 ve %86.8 olarak bulduk.

Türbidimetrik immunoassay prensibiyle çalışan orijinal Bayer marka kit ile ADVIA 1650 analizöründe yapılan bir çalışmada karbamazepin düzeyi ölçümü için yöntemin çalışma içi % CV değerleri düşük ve yüksek düzeyli serum havuzlarında sırasıyla %4.9 ve %4.8 bulunmuş. Geri kazanım oranının %R=102.2 olarak hesaplandığı çalışmada yöntemin hem FPIA hem de kemiluminesans yöntem ile korelasyonu oldukça iyiymiş ($r=0.99$, $r=0.99$) (10). Aynı kit ve aynı cihazla yapılan diğer bir çalışmada yöntemin valproik aside ait performansının değerlendirilmesinde ise çalışma içi %CV değerleri düşük ve yüksek düzeyli serum havuzları için %6.8 ve %5.9 olarak bulunurken, yöntemin FPIA ile korelasyonu da tatmin edici olarak değerlendirilmiş ($r=0.98$) (11). Fenitoin için tekrarlanan benzer bir çalışmada da düşük ve yüksek düzeylere ait çalışma içi % CV değerleri ile geri kazanım oranları sırasıyla şu şekilde hesaplanmış: %5.2, %4.1 ve %R=101.4. Sonuçların floresans polarizasyon ile korelasyonu yine oldukça iyiymiş ($r=0.98$) (12).

Daha önceki çalışmalarda türbidimetrik yöntemin antiepileptik ilaç düzeyi ölçümü için performansı floresans polarizasyon, kemiluminesans ya da diğer immunolojik tekniklerle karşılaştırılarak değerlendirilmiş. Biz ise yöntemi pek çok ilaçta olduğu gibi antiepileptik ilaçların monitorizasyonunda da referans yöntem kabul edilen HPLC tekniği ile karşılaştırdık. Immunolojik metodların her birinin linearite, sensitivite ya da spesifitelerinde farklılıklar söz konusu olduğundan, HPLC tekniği ile karşılaştırarak türbidimetrik yöntemin performansı hakkında daha güvenilir sonuçlar elde ettiğimiz düşünülebilir.

Beckman'ın türbidimetrik yöntemi, HPLC tekniği ile karşılaştırıldığında; hızlı sonuç verdiğinden ve ön işlem gerektirmediğinden acil

analiz için uygun ve daha ucuz bir yöntemdir. Ayrıca HPLC yöntemi kalifiye teknik personel gerektirmektedir.

Ancak türbidimetrik yöntemle ilaçların metabolitlerini ölçme şansı olmadığı gibi bu metabolitlerle çarpaz reaksiyon ihtimali de yüksektir. Ayrıca HPLC yöntemiyle kombine ilaç kullanan hastalarda tek ölçümle tüm ilaçların serum düzeyleri hakkında bilgi sahibi olabilirken türbidimetrik yöntemde böyle bir şansımız bulunmamaktadır.

Tabii ki pek çok analitte olduğu gibi antiepileptik ilaçların monitorizasyonunda da HPLC referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak Türkiye şartlarında halen HPLC sistemleri laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bu nedenle ülkemizde türbidimetrik yöntem ve immunoassay teknikleri antiepileptik ilaçlara ait serum düzeylerinin belirlenmesinde daha uzun yıllar kullanılacak gibi görünmektedir.

Kaynaklar

1. Steijns LSW, Bouw J, Weide J. Evaluation of fluorescence polarization assays for measuring valproic acid, phenytoin, carbamazepine and phenobarbital in serum. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 432.
2. Hermida J, Boveda MD, Vadillo FJ, Tutor JC. Comparison between the Cobas Integra immunoassay and high performance liquid chromatography for therapeutic monitoring of carbamazepine. *Clin Biochem* 2002; 35: 251.
3. Cochran EB, Massey KL, Phelps SJ, Cramer JA, Toftness BR, Denio LS, Drake ME. Comparison of a noninstrumented immunoassay for carbamazepine to high performance liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassay. *Epilepsia* 1990; 37: 480.
4. Wilson JF, Watson ID, Williams J, Toseland PA, Thomson AH, Sweeney G, Smith BL, Sandle LN, Ramsey JD, Capps NE. Primary standardization of assays for anticonvulsant drugs: Comparison of accuracy and precision. *Clin Chem* 2002; 48: 1963.
5. 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. 1; 39(1-2): 181-6.
6. Franceschi L, Furlanut M. A simple method to monitor plasma concentrations of oxcarbazepine, carbamazepine, their main metabolites and lamotrigine in epileptic patients. *Pharmacol Res* 2005. 51(4):297-302.
7. Tsanaclis LM, Wilson JF. Comparison by external quality assessment of performance of analytical systems for measurement of therapeutic drugs in serum. *Ther Drug Monit* 1997. 19(4):420-6.
8. Wilimowska J, Gamollka E, Pasich A, Jenner B, Szpak D. Comparison of fluorescence polarization immunoassay and high performance liquid chromatography for determination of carbamazepine concentration in blood of poisoned patients. *Przegl Lek.* 2005; 62(6):595-8.
9. Kubota N, Momose K, Maekowa H, Tsubota N. Turbidimetric latex agglutination inhibition immunoassay for primidone. *Biol Pharm Bull.* 1994. 17(4):463-6.
10. Dasgupta A, Datta P. Analytical performance evaluation of a new turbidimetric immunoassay for carbamazepine on the ADVIA 1650 analyzer: effect of carbamazepine 10,11-epoxide. *Ther Drug Monit* 2005. 27(1):31-4.
11. Datta P, Dasgupta A. Analytical performance evaluation of a new turbidimetric immunoassay for valproic acid on the ADVIA 1650 analyzer: effect of gross hemolysis and high bilirubin. *J Clin Lab Anal* 2005; 19(2):31-5.
12. Datta P, Scurlock D, Dasgupta A. Analytical performance evaluation of a new turbidimetric immunoassay for phenytoin on the ADVIA 1650 analyzer: effect of phenytoin metabolite and analogue. *Ther Drug Monit* 2005. 27(3):305-8.