



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

Mgr. Foltinská Blanka

HPLC metoda pro hodnocení lamotriginu a jeho příbuzných látek
v tabletách

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Hradec Králové 2010

Prohlašuji, že jsem svou rigorózní práci vypracovala samostatně. Veškerá literatura a podkladové materiály, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové 24. března 2010

Mgr. Blanka Foltinská

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu rigorózní práce PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky k rigorózní práci. Dále děkuji Mgr. Pavle Pilařové a všem pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za ochotu a vstřícné jednání.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1. PRINCIP CHROMATOGRRAFIE	12
3.2. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	14
3.2.1. CHROMATOGRAF	15
3.2.2. ZÁSOBNÍKY MOBILNÍ FÁZE	15
3.2.3. ODPLYNĚNÍ MOBILNÍ FÁZE	16
3.2.4. MOBILNÍ FÁZE	16
3.2.5. ČERPADLA	16
3.2.6. DÁVKOVACÍ ZAŘÍZENÍ VZORKU	17
3.2.7. CHROMATOGRAFICKÉ KOLONY	17
3.2.8. NÁPLNĚ KOLON (STACIONÁRNÍ FÁZE V HPLC)	18
3.2.9. DETEKTORY	19
3.2.10. VYHODNOCOvacÍ ZAŘÍZENÍ	22
3.3. VALIDACE A VALIDAČNÍ PARAMETRY	23
3.3.1. SPRÁVNOST (ACCURACY)	23
3.3.2. PŘESNOST (PRECISION)	24
3.3.3. SELEKTIVITA (SELECTIVITY)	24
3.3.4. DETEKČNÍ LIMIT (LIMIT OF DETECTION, LOD)	25
3.3.5. KVANTITATIVNÍ LIMIT (LIMIT OF QUANTIFICATION, LOQ)	25
3.3.6. LINEARITA (LINEARITY)	25
3.3.7. ROZSAH (RANGE)	26
3.3.8. ROBUSTNOST (ROBUSTNESS)	26
3.3.9. TEST ZPŮSOBILOSTI (SYSTEM SUITABILITY TEST)	26
3.4. LAMOTRIGIN A JEHO VLASTNOSTI	27
3.4.1. EPILEPSIE	27
3.4.2. FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI LAMOTRIGINU	28
3.4.3. INDIKACE A KONTRAINDIKACE LAMOTRIGINU	28
3.4.4. INTERAKCE A NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY LAMOTRIGINU	28
3.4.5. TĚHOTENSTVÍ A KOJENÍ	29
3.5. LAMOTRIGIN A JEHO NEČISTOTY	30
3.6. STANOVENÍ LAMOTRIGINU V KREVNÍ PLAZMĚ	31
3.7. LÉKOPISNÉ HODNOCENÍ LAMOTRIGINU A JEHO PŘÍBUZNÝCH LÁTEK	32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1. MATERIÁL A POMŮCKY	34
4.1.1. CHEMIKÁLIE	34
4.1.2. SESTAVA PRO HPLC S UV-VIS DETEKTOREM	34
4.1.3. PŘÍSTROJE	34
4.1.4. POMŮCKY	34
4.2. ÚPRAVA VZORKU	35
4.3. OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK	35
4.4. VALIDACE	38
4.4.1. ROBUSTNOST	38
4.4.2. LIMIT KVANTIFIKACE PRO PŘÍBUZNÉ LÁTKY	38
4.4.3. LINEARITA-PŘÍBUZNÉ LÁTKY	39
4.4.4. LINEARITA-STANOVENÍ OBSAHU	39
4.4.5. SPRÁVNOST	40
4.4.6. PŘESNOST (OPAKOVATELNOST)	41
4.4.7. SELEKTIVITA-STANOVENÍ OBSAHU	42

4.4.8.	SELEKTIVITA-PŘÍBUZNÉ LÁTKY.....	42
4.4.9.	TEST ZPŮSOBILOSTI SYSTÉMU.....	43
4.5.	ZÁVISLOST OBSAHU PŘÍBUZNÝCH LÁTEK NA DOBĚ VAŘENÍ LAMOTRIGINU	44
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE	45
5.1.	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK	46
5.2.	VALIDACE.....	49
5.2.1.	ROBUSTNOST.....	49
5.2.2.	LIMIT KVANTIFIKACE PRO PŘÍBUZNÉ LÁTKY	50
5.2.3.	LINEARITA-PŘÍBUZNÉ LÁTKY.....	51
5.2.4.	LINEARITA-STANOVENÍ OBSAHU	52
5.2.5.	SPRÁVNOST.....	54
5.2.6.	PŘESNOST (OPAKOVATELNOST).....	55
5.2.7.	SELEKTIVITA-STANOVENÍ OBSAHU.....	56
5.2.8.	SELEKTIVITA-PŘÍBUZNÉ LÁTKY.....	57
5.2.9.	TEST ZPŮSOBILOSTI SYSTÉMU.....	58
5.3.	VYPRACOVANÁ METODA PRO HODNOCENÍ LAMOTRIGINU A JEHO PŘÍBUZNÝCH LÁTEK V TABLETÁCH.....	59
5.4.	ZÁVISLOST OBSAHU PŘÍBUZNÝCH LÁTEK NA DOBĚ VAŘENÍ LAMOTRIGINU	61
6.	ZÁVĚR.....	64
7.	LITERATURA	66
	SOUHRN.....	69
	ABSTRACT.....	70

1. ÚVOD

Kontrola léčiv je profilovou farmaceutickou disciplínou, která je zaměřena na zajištění jakosti, bezpečnosti a účinnosti léčiv. K tomuto účelu využívá různé analytické metody. Z metod instrumentálně-analytických má široké uplatnění zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) se řadí mezi nejčastěji používané separační metody. Vyniká vysokou účinností, dobrou opakovatelností a robustností. Tato metoda je vhodná pro dělení netěkavých a polárních látek, jejichž analýza příbuznou plynovou chromatografií bývá často obtížná. HPLC je široce využívána ve všech moderních lékopisných monografiích, a to pro identifikaci a hodnocení obsahu léčiv a pro kontrolu jejich čistoty. HPLC se rovněž využívá při hodnocení stability léčiva, při monitorování lékových hladin a metabolitů v tělních tekutinách a v toxikologii [1, 2].

Tato práce navazuje na moji Diplomovou práci obhájenou v červnu 2009. Je zaměřena na vývoj HPLC metody pro hodnocení čistoty lamotriginu. Lamotrigin je antiepileptikum třetí generace, ovlivňuje sodíkové kanály a snižuje produkci excitačních neurotransmiterů. Je lékem první volby při částečných záchvatech, včetně záchvatů se sekundární generalizací, a lze jej použít rovněž u primárně generalizovaných tonicko-klonických křečí. Lamotrigin má monografii od 3. Doplnku 6. Evropského lékopisu 2008, v Českém lékopise 2009 monografii nemá [3].

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je vývoj HPLC metody pro hodnocení čistoty a stability lamotriginu. Aby byl získán přehled o jeho rozkladných produktech, a tedy i možných nečistotách, bude lamotrigin vystaven takovým podmínkám, za kterých dojde k jeho částečnému rozložení. Bude sledována mj. i časová závislost rozkladu léčiva. Dále budou hledány takové chromatografické podmínky, při kterých bude separace lamotriginu a jeho nečistot co nejlepší. Nalezené chromatografické podmínky budou základem analytické metody pro kvantitativní hodnocení lamotriginu a jeho příbuzných látek. Vypracovaná HPLC metoda bude po otestování validačních parametrů aplikována na kvantitativní hodnocení lamotriginu a jeho příbuzných látek v tabletách.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. PRINCIP CHROMATOGRAFIE

Chromatografie je separační metoda, tedy metoda, při které se oddělují - separují složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. Její přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody, jako např. spektrofotometrické, nelze principiálně použít [4,5].

V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Fáze, která je pohyblivá, se nazývá mobilní (plyn nebo kapalina), fáze nepohyblivá se nazývá stacionární. Stacionární fáze může nabývat nejrůznějších forem - někdy to jsou částičky tuhé látky o velikosti jednotek až stovek mikrometrů, jindy je to tenká vrstvička kapaliny nanesená na tuhých částicích, nebo tenký film kapaliny na vnitřní straně kapiláry. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované [5, 6].

Chromatografických metod je v současnosti velké množství, proto je účelné jejich rozdělení do určitých skupin. Dělí se podle několika hledisek:

- Podle skupenství mobilní fáze:
 - kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography-LC) – mobilní fáze je kapalina
 - plynová chromatografie (Gas Chromatography-GC) – mobilní fáze je plyn
- Podle uspořádání stacionární fáze:
 - kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně)
 - plošné techniky: - papírová chromatografie (Paper Chromatography-PC) – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru
 - tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography – TLC) – stacionární fáze je umístěna na pevném podkladu (skleněné desce nebo hliníkové fólii)

- Podle povahy děje, který převládá při separaci:

Obvykle se při separaci uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů současně, ale jeden z nich převládá.

- rozdělovací chromatografie – o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fázi (kapalina nebo plyn)
- adsorpční chromatografie – o separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze (tuhá látka)
- iontově-výměnná chromatografie – o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku
- gelová chromatografie – složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi (gelu); menší molekuly se v pórech gelu zadržují déle (molekulově síťový efekt)
- afinitní chromatografie – stacionární fáze je schopna vázat ve vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu) [5].

3.2. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Kolonová kapalinová chromatografie (CC, column chromatography) je metoda již dlouho známá, v klasickém provedení se používala až do poloviny šedesátých let. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) se vyvinula z plynové chromatografie v počátcích 70. let minulého století. HPLC je založena na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Během separace dochází k mnoha typům interakcí. Uplatňují se interakce analytů s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární fází a sorpce analytů na stacionární fází. Vysokých účinností se dosahuje využitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem (proto je někdy tato metoda nazývána vysokotlaká kapalinová chromatografie). Dávkuje se malá množství vzorku (řádově mikrolitry), k detekci jsou třeba citlivé detektory, které umožňují kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony. Signál detektoru se zpracovává počítačem, který v současnosti také řídí celý kapalinový chromatograf. Mezi výhody HPLC patří zejména široká oblast použitelnosti: lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery (doplňuje tak vhodně plynovou chromatografii, která umožňuje analyzovat zejména plyny a těkavé látky). Další výhodou je možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze, která na rozdíl od GC (Gas Chromatography - plynová chromatografie) není inertní, ale významně se podílí na separaci. Nevýhodou ve srovnání s GC je náročnější instrumentace a náročnější mechanismus separace [2, 5, 7].

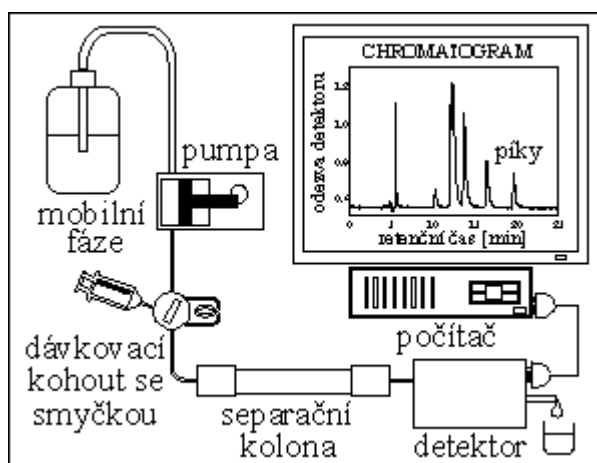
Základní charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas, což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Nejčastějším důkazem totožnosti je shoda retenčních časů chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu. Pro kvantitativní hodnocení léčiv je základem plocha (event. výška) chromatografického píku. Využívá se tzv. metoda vnějšího standardu, kdy se nastříkne roztok analyzovaného vzorku a v dalším kroku se nastříkne roztok vnějšího standardu. Koncentrace stanovovaných složek se pak vypočítá z poměru ploch píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu. U metody vnitřního standardu se ke známému objemu roztoku vzorku přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a po promíchání se nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných látek se opět vypočítá z poměru ploch píků jednotlivých

separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Tato metoda je méně časově náročná a hlavně přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku [1, 8].

3.2.1. CHROMATOGRAF

Základní technické vybavení kapalinového chromatografu sestává z čerpadla, zařízení na dávkování vzorku, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Kvalita jednotlivých prvků může výrazně ovlivnit účinnost celého chromatografického systému [6].

Jednoduché schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na obrázku (obr.č.1).



[9]

obr.č.1: Schéma chromatografu

Chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, čerpadla (pumpy), dávkovacího zařízení, rozdělovací kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení.

3.2.2. ZÁSObNÍKY MOBILNÍ FÁZE

Zásobníky mobilní fáze jsou vyráběny nejčastěji ze skla, plastu (polyethylen, polytetrafluorethylen, polypropylen) nebo nerezové oceli. Při isokratické eluci je mobilní fáze vedena ze zásobníku mobilní fáze do vysokotlakého čerpadla (složení mobilní fáze je tedy v průběhu celé analýzy konstantní), při gradientové eluci se přiváděné proudy ze dvou nebo více zásobníků mísí podle programu ve směšovači, který je zařazený před nebo za vysokotlakým čerpadlem (složení mobilní fáze je tedy během analýzy programově měněno) [1, 10, 11].

3.2.3. ODPLYNĚNÍ MOBILNÍ FÁZE

Odvzdušnění či odplyněné mobilní fáze je velmi důležitý krok při přípravě mobilní fáze, protože může odstranit většinu problémů vznikající při chromatografické analýze. Odvzdušnění mobilní fáze přináší řadu výhod - reprodukovatelné retenční časy, reprodukovatelnost objemu nástřiku, stabilní průtok mobilní fáze, nízký šum základní linie a vysokou citlivost u mnoha typů chromatografických detektorů.

K odvzdušnění mobilní fáze se používají čtyři metody, které se mohou vzájemně kombinovat: vakuová filtrace; sonikace, probublávání mobilní fáze heliem (sparging), ohřev mobilní fáze (u velmi těkavých rozpouštědel je však tento způsob nepoužitelný) nebo vakuový degaser. Moderním řešením jsou průtokové membránové odplynovače. Při vakuovém průtokovém odplynování je využívána schopnost membrány propouštět molekuly plynů. Prakticky je zařízení realizováno jako jedna nebo více kapilár umístěných ve vakuových komorách [12, 13].

3.2.4. MOBILNÍ FÁZE

Mobilní fáze v kapalinové chromatografii není inertní, ale významně se podílí na separačním procesu. Možnosti změny složení mobilní fáze jsou prakticky neomezené. Složení mobilní fáze ovlivňujeme změnami složení rozpouštědel, pH, iontové síly, iontově párovými činidly atd. Ve dvousložkových systémech dochází k poklesu retence s rostoucí objemovou frakcí organického rozpouštědla a s klesající polaritou organického rozpouštědla v mobilní fázi. Silně polární a iontové látky na nepolárních fázích se zadržují velmi málo nebo vůbec ne a eluují se v mrtvém objemu kolony nebo dříve. Pro látky iontové povahy proto můžeme jejich chromatografické chování ovlivnit volbou pH mobilní fáze, kdy změnou pH mobilní fáze dochází k disociaci slabých kyselin ($\text{pH} < 7$) či slabých bazí ($\text{pH} > 7$). Potlačení disociace dochází ke zvýšení retence a zamezení chvostování píku dané chromatografické látky. Hodnoty pH lze měnit ovšem pouze v rozsahu, který nám dovolí použitý sorbent kolony [7, 12].

3.2.5. ČERPADLA

Čerpadla mobilní fáze musí být vysokotlaká (kolony s velikostí částic okolo $10\mu\text{m}$ a menší kladou velký odpor a k dosažení optimálních průtoků jsou nutné vysoké vstupní tlaky, až desítky MPa), musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze (tento průtok pro klasickou HPLC má být regulovatelný v rozsahu $0,1$ až 10 ml min^{-1}), průtok

mobilní fáze musí být reprodukovatelný a bezpulsní. Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika, plast) nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky. Používají se čerpadla pístová, kdy při každém pohybu pístu vpřed dochází k vytlačení malého objemu mobilní fáze do chromatografického systému a při pohybu zpět se komora naplní. Výhodou těchto čerpadel je nepřetržitá dodávka mobilní fáze a snadná změna mobilní fáze. Pulsaci lze značně omezit použitím dvou nebo více čerpadel současně, zařazením tlumiče pulzů a programovaným pohybem pístů. Dále se používají membránová čerpadla, kde je prostor s pístem naplněný hydraulickou pracovní kapalinou, který je oddělen od pracovního prostoru pro mobilní fázi membránou [5, 6, 7].

3.2.6. DÁVKOVACÍ ZAŘÍZENÍ VZORKU

Dřívější dávkování injekční stříkačkou přinášelo značné nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku a zejména vnášení stop materiálu injekční stříkačky, proto jsou v současné době injekční systémy nahrazeny dávkovacími vysokotlakými ventily. Nejčastěji se používá šesticestný kohout s dávkovací smyčkou. Při dávkování se nejprve naplní smyčka vzorkem a potom se kohout přepne do druhé polohy, kdy eluent protéká smyčkou a unáší vzorek do kolony. Smyčky se naplňují z mikrostříkačky přesně odměřenými objemy, a tak umožňují nástřik libovolného množství až do plného objemu smyčky. Dávkování je reprodukovatelné a lze jej snadno automatizovat. Dnes se využívají automatické dávkovače (autosamplery), které jsou spojené se zásobníkem vzorků, ve kterém jsou umístěny mikronádobky (vialky) uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu nebo silikonu s teflonovou fólií. Prostor pro vzorky je v současné době většinou temperován (0-50°C) a chráněn před světlem [5, 6, 7, 12].

3.2.7. CHROMATOGRAFICKÉ KOLONY

Chromatografické kolony pro analytické účely jsou většinou rovné trubice, jejichž délka se pohybuje v rozmezí 10-25 cm a vnitřní průměr 3-5 mm. Nejběžnějším materiálem pro tlakové kolony je nerezová ocel a tvrzené sklo. U vysokoúčinných kolon je důležité, aby jejich vnitřní průměr byl přesně stejný po celé délce a jejich vnitřní povrch zcela hladký, popř. leštěný. V případě náplňových kolon je sorbent uložen na fritě, která může být ze sintrovaného skla, nerezové oceli nebo porézního teflonu. Kolony se plní většinou kulovými částicemi sorbentu o průměru 3, 5 nebo 10 μm .

Kompaktnější zaplnění prostoru v koloně nabízejí monolitické kolony. Kolona je zcela vyplněna polymerem o definované pórovitosti, buď organického nebo anorganického původu, který se uvnitř kolony vytvoří vhodnou polymerační reakcí v roztoku. Kvalita kolon se tak zlepší ve srovnání s kolonami náplňovými. Monolitické kolony se vyznačují velkou mechanickou stabilitou a velkou účinností i při velkých průtocích mobilní fáze. Se zvýšeným průtokem nenarůstá tlak tak silně jako u náplňových kolon, takže umožňují použití průtokového gradientu.

Jako ochrana hlavní kolony před nečistotami jsou hojně využívány předkolony umístěné mezi čerpadlo a dávkovací zařízení, nebo ochranné kolony umístěné mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu.

V současnosti je jedním z hlavních trendů v HPLC miniaturizace. Mezi výhody miniaturizace patří snížení spotřeby a odpadu rozpouštědel, snížení spotřeby vzorku, vyšší hmotnostní citlivost a lepší kompatibilita s MS-detekcí [1, 5, 7].

3.2.8. NÁPLNĚ KOLON (STACIONÁRNÍ FÁZE V HPLC)

V HPLC se nejčastěji používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze (zejména nepolární reverzní fáze), neboť mají mnoho výhod. Dovolují aplikace pro analyty s širokým rozsahem polarit (látky nepolární, ionizovatelné i polární), reverzní chromatografie je experimentálně jednodušší, rychlejší a reprodukovatelnější než ostatní metody, v kombinaci s vhodnými mobilními fázemi umožňují přímou aplikaci na biologické systémy (krevní plazma apod.). Nevýhodou je, že chemicky vázané fáze na bázi silikagelu jsou stabilní jen v omezeném rozsahu pH (2,5 až 8). Přesto je silikagel stále nejběžnějším nosičem pro chemicky vázané fáze. Silikagel obsahuje volné silanolové skupiny $-Si-OH$ s aktivním vodíkovým atomem, který může být nahrazen různými funkčními skupinami R a tak připraveny různé stacionární fáze o různých vlastnostech. Nejběžnější jsou oktadecylsiloxanové fáze (označované jako tzv. reverzní fáze - jde o nepolární chemicky vázané fáze). Časté jsou kratší alkyly, jako je butyl či oktyl. Mezi středně polární fáze patří fenylové, polární jsou pak kyanoethylové fáze. Navázáním aminopropylové skupiny vznikne slabý měnič aniontů, fáze se sulfobutylovými skupinami mají charakter silných měničů kationtů a podobně. Vazbou chirálního selektoru lze připravit chirální fáze. Ve snaze vyhnout se výše uvedeným nevýhodám silikagelu jako nosiče chemicky vázané fáze, se používají stále více jiné materiály, např. oxid zirkoničitý a titaničitý, které jsou stálé v širším rozsahu pH. Uplatnění nacházejí též různě modifikované organické polymery.

Jako sorbenty se rovněž používají silikagel a oxid hlinitý, i když se používají daleko méně než chemicky vázané stacionární fáze. Silikagel je dostupný s různě velkými částicemi, s částicemi kulovými nebo nepravidelnými. Je polární, neboť na povrchu obsahuje skupiny silanolové (-SiOH) a siloxanové (Si-O-Si). Dosažitelnost silanolových skupin je důležitá pro separaci (specifické interakce pomocí vodíkových vazeb), siloxanové skupiny jsou naopak nežádoucí. Nevýhodou silikagelu je jeho malá stabilita při pH menším než 2 a větším než 8, výhodou je snadná dostupnost a přijatelná cena. Alumina (oxid hlinitý) je vyráběna ve formě porézních kuliček, stejně jako silikagel. Může být neutrální, bazická i kyselá, její významnou vlastností je stabilita v rozsahu pH 2-12 [1, 7].

Kolona Waters Spherisorb Phenyl

Je to fenylová stacionární fáze. Základem je porézní, sférický silikagel s vynikající chemickou stabilitou, na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrn je vhodnou chemickou reakcí navázán fenyl. Patří mezi chemicky vázané středně polární stacionární fáze. Fenylové stacionární fáze interagují se sloučeninami obsahujícími aromatické skupiny nebo nenasycené vazby prostřednictvím π - π interakcí [7, 12, 14].

Kolona Discovery HS F5

Je to pentafluorofenylová stacionární fáze. Tato fáze patří mezi chemicky vázané polární stacionární fáze. Silikagel kolon Discovery je stabilní, inertní, s nízkým obsahem příměsí. Zkratka HS vychází z anglického „high surface“, je to tedy kolona s velkým specifickým povrchem. Je určena pro speciální analyty jako např. látky bazické a halogenované deriváty [12, 15].

3.2.9. DETEKTORY

V současné době jsou v podstatě všechny detektory koncentrační a lze je rozdělit do dvou skupin, a to na detektory selektivní (jejich signál je úměrný pouze koncentraci detekované komponenty v eluátu) a detektory univerzální (jejich signál je úměrný celkové vlastnosti eluátu jako celku, tj. mobilní fázi a detekované komponenty).

Na detektory v HPLC jsou kladeny mimořádné požadavky:

- vysoká citlivost (detekce látek v roztoku v koncentracích ng až $\mu\text{g/ml}$) a nízká úroveň šumu
- reprodukovatelnost a linearita odezvy

- univerzálnost (detekce všech oddělených složek vzorku)
- nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci
- robustnost vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty [4, 12]

Spektrofotometrické detektory

Tyto detektory patří k nejpoužívanějším v HPLC, neboť jsou poměrně jednoduché, provozně spolehlivé, lze jimi detekovat velký počet látek a jsou kompatibilní s gradientovou elucí. Jsou selektivní a mají velkou citlivost (10^{-9} až 10^{-10} g/ml). Proměřují absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékající celou detektorem. K detekci se využívá především UV oblast spektra, mnohem méně oblast viditelná. Nejužívanější jsou UV detektory s fixní vlnovou délkou nebo s proměnnou vlnovou délkou. Složitější systém představují rychlé skenovací spektrofotometrické detektory. Diode array detektor (detektor s diodovým polem) umožňuje opakovaně zaznamenávat celá spektra během průchodu látky kyvetou. Získávají se tak trojrozměrné chromatogramy (retenční čas vs. absorbance vs. vlnová délka), ze kterých lze rychle identifikovat eluované látky a posoudit jejich čistotu [1, 4, 7].

Fluorimetrické detektory

Tyto detektory jsou velmi selektivní pro látky, které mají přirozenou fluorescenci nebo je lze na fluoreskující deriváty převést. Jsou rovněž velmi citlivé (10^{-9} až 10^{-12} g/ml). Princip detekce je založen na tom, že analyt je ozařován zářením o určité vlnové délce (excitující záření ze zdroje, tj. rtuťové výbojky, deuteriové, wolframové či xenonové lampy či laseru) a produkuje záření o větší vlnové délce (emitované-fluorescenční záření). Intenzita emitovaného záření je přímo úměrná koncentraci látky ve vzorku [1, 7].

Refraktometrické detektory

Patří mezi nespecifické (univerzální) detektory. Měří se rozdíl indexů lomu solutu v mobilní fázi proti mobilní fázi. Protože tyto rozdíly jsou malé, je refraktometrický detektor málo citlivý (10^{-6} g/ml). Nevýhodou je i značná závislost indexu lomu na teplotě a nemožnost použít gradientovou eluci. V kontrole léčiv mají minimální použití [1, 7].

Elektrochemické detektory

Patří mezi selektivní detektory, jsou velmi citlivé (10^{-9} až 10^{-12} g/ml). Tyto detektory mají uplatnění tam, kde jsou v roztocích obsaženy ionty resp. složky oxidovatelné nebo redukovatelné na polarizovatelné elektrodě. Měří se proud procházející mezi polarizovatelnou pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí. Nejčastěji používané jsou polarografické detektory (pracují s rtuťovou kapkovou elektrodou) a ampérometrické detektory (používají tuhých měrných elektrod, zhotovených nejčastěji ze skelného uhlíku, grafitových vláken, zlata, platiny, mědi či jiného kovu). Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci či k redukcí celkového množství látky při jejím průtoku měrnou celou detektoru a tak dosahují vyšší citlivost detekce [5, 12].

Vodivostní detektory

Tyto detektory patří mezi univerzální detektory. Měří elektrickou vodivost eluátu mezi dvěma elektrodami (většinou platinovými), na něž je vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci těchto elektrod. Používá se pro detekci iontů při iontové chromatografii [6, 12].

Hmotnostní detektory

Spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS) je dnes již poměrně časté, hmotnostní detektory jsou vysoce selektivní a citlivé. Nevýhodou je finanční náročnost a náročnost na obsluhu. Po výstupu HPLC kolony je nutno z eluentu odstranit kapalnou mobilní fázi a převést léčivo do plynné fáze. V plynné fázi jsou pak molekuly léčiva ionizovány nárazy elektronů, termoionizací či elektroionizací. Nabité částice (molekulární a fragmentární ionty) jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje a je zaznamenáno hmotnostní spektrum (tj. četnost iontů ve vztahu k poměru - hmotnost/počet nábojů). Hmotnostní spektrometrie poskytuje cenné strukturní informace - umožňuje identifikovat jednotlivé složky směsi [1].

3.2.10. VYHODNOCOVACÍ ZAŘÍZENÍ

Dnes používané přístroje pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii jsou vybavené vyhodnocovacím zařízením, které automaticky vyhodnocuje odezvu detektoru (elektronický integrátor) a poskytuje tak automatické (počítačové) vyhodnocení výsledků analýz. Používají se počítače vybavené speciálním softwarem. Ty mimoto řídí chod celého chromatografu (složení a průtok mobilní fáze, teplota na koloně, nastavení detektoru, objem a sekvence vzorků dávkovaných na kolonu apod.) [1, 10, 16].

3.3. VALIDACE A VALIDAČNÍ PARAMETRY

Validace analytické metody je proces, kterým se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody, cílem je ověření platnosti zvoleného analytického postupu či metody. Smyslem validace je demonstrovat, že vypracovaná metoda je pro daný účel vhodná a určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný. Vlastnost, která je předmětem validace, se nazývá validovaná vlastnost (koncentrace hlavní látky, koncentrace nečistoty, fyzikálně chemický parametr). Validace se používá vždy při vývoji nové metody, má-li být přenesena do jiné laboratoře, nebo při průkazu rovnocennosti dvou metod [8, 12].

3.3.1. SPRÁVNOST (ACCURACY)

Vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou. Správnou hodnotu lze zjistit buď jinou nezávislou metodou s ověřenou správností, nebo se připraví modelový vzorek ze všech složek přípravku a přesně přidaného standardu. Nejsou-li k dispozici všechny složky přípravku, analyzuje se přípravek se známým přídavkem standardu. Správnost se obvykle zjistí analýzou nejméně šesti vzorků a vyjádří se jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost (recovery):

$$\text{recovery (\%)} = \frac{\text{nalezená hodnota} * 100}{\text{správná hodnota}}$$

[8]

3.3.2. PŘESNOST (PRECISION)

Přesnost je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem. Obvykle se tento vzorek nezávisle šestkrát analyzuje kompletním postupem včetně přípravy vzorku. Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka těchto šesti stanovení:

$$\text{RSD}_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} * \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

y – jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plochy píků, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu

\bar{y} - průměr jednotlivých hodnot

n – počet jednotlivých hodnot

Podle podmínek opakování se rozlišují tři úrovně přesnosti:

Opakovatelnost (repeatability) – metoda se opakuje stejným způsobem jedním pracovníkem se stejnými činidly na tomtéž přístroji

Mezilehlá přesnost (intermediate precision) – metoda se provádí s různými činidly, analytiky i přístroji, v různý den, ale v jedné laboratoři a se stejným homogenizovaným vzorkem

Reprodukovatelnost (reproducibility) – provedení je stejné jako u mezilehlé přesnosti s tím rozdílem, že probíhá v různých laboratořích [8, 17, 18].

3.3.3. SELEKTIVITA (SELECTIVITY)

Selektivita analytické metody je definována jako schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti jiných látek, jež lze očekávat. To mohou být další účinné látky u složených přípravků, pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla. Tento parametr se doloží výsledky analýzy standardů, a dále např. vzorků bez analyzované látky obsahujících všechny složky přípravku, rozkladné produkty, nečistoty [8, 12].

3.3.4. DETEKČNÍ LIMIT (LIMIT OF DETECTION, LOD)

Tento parametr vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovované kvantitativně. U instrumentálních metod se může určit jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. Nalezený detekční limit se ověří analýzou příslušné koncentrace vzorku. [8]

Poměr signálu k šumu se vypočítá podle vzorce:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

H – výšku píku odpovídajícího dané složce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřenou od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje ve vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky

h – rozpětí šumu pozadí chromatogramu získaného při slepé zkoušce a zaznamenávaného na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku, a to pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík [17, 18].

3.3.5. KVANTITATIVNÍ LIMIT (LIMIT OF QUANTIFICATION, LOQ)

Je též parametrem citlivosti metody. Je to nejnižší koncentrace látky, stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Za limitující relativní směrodatnou odchylku se považuje 10%, proto je možné kvantitativní limit vyjádřit jako koncentraci, při jejíž analýze se dosáhne této relativní směrodatné odchylky. Obvykle to bývá trojnásobek detekčního limitu. Často se vyjadřuje jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10 [8].

3.3.6. LINEARITA (LINEARITY)

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient (r). Při lineární závislosti nabývá hodnoty +1 a čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější. Obvykle se stanovuje minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50-150% deklarovaného obsahu, pro stanovení příbuzných látek se používá obvykle rozmezí LOQ až 120 % povoleného limitu. Může se pracovat s roztoky standardů, neboť rušivé vlivy u reálných vzorků jsou hodnoceny jinými parametry validace [8, 12].

3.3.7. ROZSAH (RANGE)

Tento parametr se obvykle odvozuje z linearity metody a rozumí se jím koncentrační hranice, v kterých může být metoda používána. Dolním limitem může být například detekční limit a horní může být určen maximální odezvou, při jejímž překročení už přístroj nepracuje přesně [8].

3.3.8. ROBUSTNOST (ROBUSTNESS)

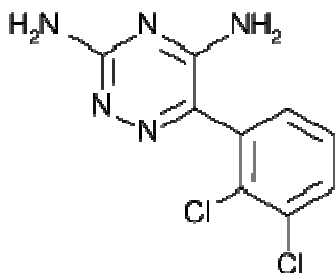
Robustnost metody je definována jako míra vlivu kolísání úrovně jednotlivých parametrů na výsledek analytického stanovení. Sbírají se poznatky z vývoje metody a cílem je upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky. U metody využívající HPLC se sledují vlivy: složení mobilní fáze, pH vodné složky mobilní fáze, teplota na koloně, rychlost průtoku, stabilita analyzovaných vzorků, rozdíl mezi kolonami různých šarží popřípadě i výrobců atd [8, 12].

3.3.9. TEST ZPŮSOBILOSTI (SYSTEM SUITABILITY TEST)

Test způsobilosti analytického systému je nedílnou součástí validace analytické metody. U instrumentálních fyzikálně chemických metod (především separačních) není v podstatě možné definovat všechny podmínky, za kterých má být metoda použita, aby poskytovala spolehlivé výsledky. Při každém novém použití metody se neopakuje celá validace, ale jsou definována určitá kritéria, která musí být splněna a která se obecně nazývají test způsobilosti analytického systému. Pomocí porovnávacích roztoků se nejčastěji zjišťují následující parametry: účinnost, kapacitní faktor (hmotnostní distribuční poměr D_m), rozlišení, relativní retence a faktor symetrie, které musí odpovídat předepsaným, např. lékopisným hodnotám [8].

3.4. LAMOTRIGIN A JEHO VLASTNOSTI

Strukturní vzorec:



[19]

Sumární vzorec: $C_9H_7Cl_2N_5$

Chemický název: 3,5-diamino-6-(2,3-dichlorphenyl)-1,2,4-triazin (IUPAC)

M_R : 256,1 [20]

3.4.1. EPILEPSIE

Epileptické onemocnění je definováno spontánně se opakujícími, nevyprovokovanými epileptickými záchvaty. Ty jsou podmíněny patologickou epileptickou aktivitou, která postihuje mozek v různém rozsahu, lokalizovaně, fokálně (záchvaty fokální, parciální) či generalizovaně (záchvaty generalizované). Epileptický záchvat je vyvoláván spontánní synchronizovanou masivní excitací větší populace neuronů, která vede k lokalizované nebo generalizované aktivaci motorických (křeče), sensorických (smyslové vjemy), vegetativních (např. slinění) nebo komplexních (kognitivních, emocionálních) funkcí. Klinicky se stav projevuje: poruchou vědomí (ztráta vědomí, absence – „petit mal“), abnormální motorickou aktivitou (generalizované nebo lokalizované křeče tonické, klonické nebo tonicko-klonické – „grand mal“ nebo myoklonie či atonie), somatosenzorickými příznaky (parestesie, audiovizuální halucinace), psychickými příznaky. Epilepsie mohou být idiopatické (primární), bez poznané příčiny, nebo sekundární, vyvíjející se jako následek ložiskových nebo difuzních postižení mozku z nitrolebních (např. trauma, zánět, nádor, cerebrovaskulární okluze) nebo extrakraniálních příčin (např. vlivy metabolické nebo toxické, uváděné někdy jako příčiny reversibilní) [3, 21, 22].

3.4.2. FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI LAMOTRIGINU

Lamotrigin je novodobé antiepileptikum se širokým antikonvulzivním účinkem. Svým mechanismem účinku se liší od předchozích látek. Zabraňuje nadměrnému uvolňování excitačních aminokyselin (zejména glutamátu) stabilizací presynaptické neuronální membrány (blokáda sodíkových kanálů závislých na úrovni depolarizačního napětí). Osvědčil se zejména u epilepsie rezistentní na terapii ostatními látkami. Tak jako je tomu u ostatních antiepileptik, náhlé ukončení aplikace lamotriginu může znovu vyprovokovat (rebound) epileptické záchvaty. Pokud nejsou urgentní bezpečnostní důvody k náhlému vysazení tohoto léčiva, má se lamotrigin vysazovat postupným snižováním dávky v průběhu dvou týdnů [23, 24].

3.4.3. INDIKACE A KONTRAINDIKACE LAMOTRIGINU

Lamotrigin je indikován ke kombinované farmakoterapii nebo k monoterapii epilepsie s parciálními a generalizovanými záchvaty, včetně tonicko-klonických záchvatů. Je také indikován jako monoterapie u záchvatů typu absencí. Důležitým jeho účinkem se zdá být jeho příznivé ovlivnění psychiky pacienta. Používá se k prevenci epizod poruchy nálady (deprese, mánie, hypománie, smíšené epizody) u pacientů s bipolární poruchou. Zvažuje se též jeho použití u některých forem parkinsonismu.

Je kontraindikován při přecitlivělosti na složky přípravku, nedoporučuje se podávání dětem mladším 2 let (pro nedostatek zkušeností). Pro možné zkřížené reakce se má lamotrigin podávat se zvláštní opatrností osobám se známou přecitlivělostí na karbamazepin a fenytoin [23, 24, 25].

3.4.4. INTERAKCE A NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY LAMOTRIGINU

Bylo prokázáno, že na metabolismu lamotriginu se podílí enzym UDP-glukuronyl transferáza. Valproát, jenž inhibuje glukuronidaci lamotriginu, zpomaluje metabolismus lamotriginu a přibližně na dvojnásobek prodlužuje průměrný poločas lamotriginu. Léčiva, které signifikantně indukují glukuronidaci lamotriginu (karbamazepin, fenytoin, primidon, fenobarbital, rifampicin), metabolismu lamotriginu urychlují. Perorální kontraceptiva mohou zvyšovat clearance lamotriginu a snižovat tak jeho plazmatické hladiny, může být nutná úprava dávkování lamotriginu v udržovací léčbě. U pacientů užívajících karbamazepin byly po přidavném zavedení lamotriginové terapie hlášeny nežádoucí příznaky ze strany centrálního nervového systému zahrnující závrať, ataxii,

diplopii, rozmazané vidění a nauzeu. Takovéto příhody obvykle ustoupí po snížení dávky karbamazepinu [24, 26].

Při užívání lamotriginu se může vyskytnout exantém, (až u 10% pacientů), vzácně závažné kožní reakce jako Stevens-Johnsonův syndrom a toxická epidermální nekrolýza. U dětí je riziko závažných kožních reakcí vyšší než u dospělých. Další velmi časté nežádoucí účinky jsou bolest hlavy, závratě, diplopie, neostře vidění; časté podrážděnost, únava, ospalost nebo nespavost, třes, nystagmus, ataxie, nauzea, zvracení, průjem. Velmi vzácně se může vyskytnout syndrom přecitlivělosti, včetně symptomů jako horečka, lymfadenopatie, otok obličeje, abnormální hematologické a jaterní nálezy, diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC), multiorgánové selhání [26].

3.4.5. TĚHOTENSTVÍ A KOJENÍ

Lamotrigin je preferován u dívek a žen ve fertilním věku. V reprodukčních studiích u pokusných zvířat podávání lamotriginu fertilitu nenarušilo, s vlivem lamotriginu na lidskou fertilitu nejsou zkušenosti [21, 24].

Riziko výskytu vrozených malformací se zvyšuje 2 až 3 násobně u potomků matek užívajících v těhotenství antiepileptickou léčbu ve srovnání s rizikem výskytu malformací u normální populace, kde je toto přibližně 3%. Mezi nejčastější malformace patří rozštěpy patra, kardiovaskulární malformace a defekty neurální trubice. Kombinovaná antiepileptická léčba je spojována s vyšším rizikem výskytu vrozených malformací, než je tomu u monoterapie, a proto má být monoterapie použita, kdykoliv je to možné. Epidemiologické studie zahrnující přibližně 2000 žen užívajících lamotrigin v monoterapii během těhotenství nemohou vyloučit zvýšené riziko výskytu vrozených malformací. Jeden registr těhotných prokázal zvýšení incidence rozštěpových vad obličeje. Jiné databáze tyto údaje nepotvrdily. Studie na zvířatech prokázaly reprodukční toxicitu. Je-li léčba lamotriginem v období těhotenství považována za nezbytnou, doporučuje se podat nejnižší možnou terapeutickou dávku.

Lamotrigin je slabým inhibitorem dihydrofolátreduktázy, a proto teoreticky může vést ke zvýšení rizika poškození plodu cestou snížení hladiny kyseliny listové. Při plánování těhotenství a v časném období těhotenství by měla být podávána kyselina listová [24].

3.5. LAMOTRIGIN A JEHO NEČISTOTY

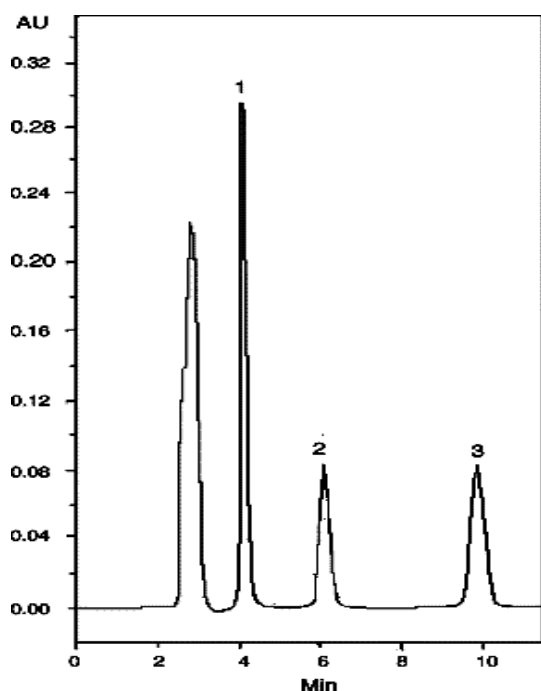
Jednou z možných nečistot lamotriginu je 3-amino-6-(2,3-dichlorphenyl)-1,2,4-triazine-5-(4H)-on, který může vznikat při hydrolyze. Druhou možnou nečistotou je N-[5-amino-6-(2,3-dichlorphenyl)-1,2,4-triazin-3-yl]-2,3-dichlorbenzamid, který se může vyskytnout jako kontaminant pocházející z bočních reakcí, které mohou probíhat při syntéze lamotriginu [27].

Dalšími nečistotami lamotriginu mohou být zejména jeho různé isomery, jako např. otevřená forma lamotriginu, 2,4-dichlorolamotrigin, 3,5-dichlorolamotrigine, 3,4-dichlorolamotrigin, 3-chlorolamotrigin, 4-chlorolamotrigin, 2-chlorolamotrigin, 2,5-dichlorolamotrigin, 2,3,4-trichlorolamotrigin. Odborný článek v Journal of Chromatography [28] se zabývá separací těchto možných nečistot lamotriginu za použití speciálního softwaru. Byl připraven vzorek obsahující lamotrigin a jeho neznámé isomery. Pracovalo se na chromatografické koloně Inertsil ODS 3 (100 mm x 4,6 mm; 5 μ m), průtok 1,5 ml/min, UV detekce při 250 nm, teplota na koloně 40°C. Byla použita gradientová eluce: 0. minuta - 1% triethylamin pH 2 a acetonitril v poměru 90:10, 39. minuta - 1% triethylamin pH 2 a acetonitril v poměru 75:25, 50. minuta - 1% triethylamin pH 2 a acetonitril v poměru 25:75, za použití softwaru ChromSword®-Auto. Všechny výše uvedené možné nečistoty lamotriginu se za těchto podmínek dobře separovaly [28].

Odborný článek v Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [29] se zabývá vývojem a validací metody pro kvantifikaci lamotriginu a jeho příbuzných látek. Pracovalo se s lamotriginem a standardy nečistot A a B. Nečistota A je 3-amino-6-(2,3-dichlorphenyl)-3,6-dihydro-1,2,4-triazin-5-(4H)-on a nečistota B je N-[5-amino-6-(2,3-dichlorphenyl)-1,2,4-triazine-3-yl]-2,3-dichlorbenzamid.

Byla použita kolona C₁₈ μ -Bondapack (250 mm x 4,6 mm), průtok 1,5 ml/min, teplota na koloně 40°C, UV detekce při 210 nm. Jako mobilní fáze byla zvolena směs acetonitrilu a roztoku KH₂PO₄ (1,4 g na 1000ml) v poměru 35:65, pH mobilní fáze se upravilo kyselinou fosforečnou na hodnotu 3,5. Separace lamotriginu a jeho nečistot byla velmi dobrá [29].

Obr.č.2: 1-lamotrigin, 2-nečistota A, 3-nečistota B [29]



3.6. STANOVENÍ LAMOTRIGINU V KREVNÍ PLAZMĚ

Existuje řada prací zabývajících se stanovením lamotriginu v plazmě pomocí HPLC. Analýza byla provedena např. za použití kolony C8 RP, mobilní fáze methanol a 0,45 mM fosfátový pufr o pH 3,5 obsahující 0,17% triethylaminu (24:76) [30]. Často se používá reverzní fáze C18, např. μ -Bondapack C18, za použití mobilní fáze 30mM pufr fosforečnanu draselného (pH 3,7 - upraveno 5% kyselinou fosforečnou) a acetonitril v poměru 65:35 [31]; nebo kolona Symmetry C18, za použití mobilní fáze pufr fosforečnanu draselného, acetonitril, methanol v poměru 70:20:10, pH 6,7 [32]. Diplomová práce [33] se zabývá stanovením lamotriginu spolu s ostatními antiepileptiky (a to s primidonem, fenobarbitalem, karbamazepinem a fenytoinem). Byla použita kolona Separon SGX C18 1x150 mm, 5 μ m, průtok 0,1 ml/min, UV detekce při 220 nm. Cílem bylo optimalizovat chromatografické podmínky, a to zejména složení mobilní fáze. Jako nejvýhodnější se ukázala mobilní fáze obsahující vodu, acetonitril, methanol v poměru 72:23:5, 300 μ l triethylaminu/100 ml, pH upraveno kyselinou fosforečnou o koncentraci 1 mol/l na hodnotu 4,0 [33].

3.7. LÉKOPISNÉ HODNOCENÍ LAMOTRIGINU A JEHO PŘÍBUZNÝCH LÁTEK

Lamotrigin má monografii od 3. Doplnku 6. Evropského lékopisu 2008 (Ph. Eur. Suppl. 6.3). V části *Příbuzné látky* je předepsána reverzní fáze C18 a gradientová eluce za použití mobilní fáze složené z acetonitrilu a pufru obsahujícího triethylamin a dihydrogenfosforečnan draselný, pH pufru se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 2,0 [34]. Do ČL 2009 ještě nebyl zařazen.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. MATERIÁL A POMŮCKY

4.1.1. CHEMIKÁLIE

- Lamotrigin š.A1336030 pracovní standard
- Tablety s obsahem 100 mg lamotriginu
- Tabletovina neobsahující lamotrigin (placebo)
- Acetonitril Lichrosolv, Merk, Damstadt, Německo
- Kyselina fosforečná 85%, Lachema n.p. Brno, závod Neratovice, Česká republika
- Hydrogenfosforečnan didraselný p.a., RNDr.J.Kulich, Hradec Králové/Říčany, Česká republika
- Voda čištěná reverzní osmózou

4.1.2. SESTAVA PRO HPLC S UV-VIS DETEKTOREM

- Kontrolní jednotka: CTO-20AC VP Shimadzu
- Čerpadlo: LC-20AD VP Shimadzu
- Termostat kolony: CTO-20AS VP Shimadzu
- PC Program: Shimadzu-CLASS-VP 5
- UV-VIS detektor: SPD-20A VP Shimadzu
- Autosampler: SIL-20AC VP Shimadzu

4.1.3. PŘÍSTROJE

- Digitální váhy, A&D HR 120, Helago s.r.o
- pH-metr SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH
- Ultrazvuková lázeň K10, Kraittek, Slovensko

4.1.4. POMŮCKY

- kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, mikropipeta, dělené pipety, nedělené pipety, balónek k pipetě, membránový nylonový filtr 0,45 μm – Agilent – 47mm/0,45 μm , membránový filtr Chromafil AO-45/25 0,45 μm průměr 25mm, nálevky, stříčka, laboratorní lžička, alobal, zátky se zábrusem, svorky, držáky, vialky, třenka s těrkou

4.2. ÚPRAVA VZORKU

Lamotrigin byl vystaven takovým podmínkám, aby došlo k jeho rozložení a rozkladné produkty se následně mohly hodnotit.

Vzorek č.1: Asi 10 mg lamotriginu ($m=0,0115$) pracovního standardu se v kádince rozpustilo asi v 50 ml vody a nechalo se vařit 240 minut. V průběhu vaření bylo nutno doplňovat odpařenou vodu. Poté se roztok přelil do 50ml odměrné baňky a doplnil vodou po rysku.

4.3. OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK

Byly hledány takové chromatografické podmínky, za kterých bude separace lamotriginu a jeho nečistot co nejlepší. Byly vyzkoušeny různé chromatografické kolony a optimalizovalo se zejména složení mobilní fáze. Pracovalo se se vzorkem č.1.

Kolona č.1: Waters Spherisorb 5 μ m Phenyl, 4,6 x 250mm

Průtok: 1,0 ml/min, nástřik 20 μ l, UV detekce při 309 nm, teplota kolony 40 °C

Mobilní fáze č.1: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 35:65; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 7,0

Mobilní fáze č.2: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 40:60; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 7,0

Mobilní fáze č.3: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 35:65; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 6,0

Mobilní fáze č.4: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 30:70; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 7,0

Mobilní fáze č.5: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 35:65; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 5,0

Kolona č.2: Discovery HS F5 5 µm, 15cm x 4,6 mm, SLO70613BQP

Předkolona: Discovery HS C18, 2cm x 2,1 mm, 5 µm KIT

Průtok: 1,0 ml/min, nástřik 20 µl, detekce 309 nm, teplota kolony 40 °C

Mobilní fáze č.1: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 35:65; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 7,0

Mobilní fáze č.2: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 35:65; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 4,0

Mobilní fáze č.3: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 35:65; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 3,0

Mobilní fáze č.4: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 35:65; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 6,0

Mobilní fáze č.5: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 35:65; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 5,0

Mobilní fáze č.6: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 40:60; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 5,0

Mobilní fáze č.7: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 40:60; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 4,9

Mobilní fáze č.8: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 40:60; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 5,1

Mobilní fáze č.9: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 30:70; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 5,0

Mobilní fáze č.10: Acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 40:60; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 5,2

Příprava mobilní fáze: 0,35 g K_2HPO_4 se rozpustilo ve 250ml odměrné baňce ve vodě a doplnilo vodou po rysku. Do kádinky se odměrným válcem odměřilo příslušné množství pufru hydrogenfosforečnanu didraselného a acetonitrilu. Do kádinky umístěné na magnetické míchačce se vložilo míchadlo a elektrody pH metru. Za soustavného míchání byla pomocí pipety přikapávána kyselina fosforečná 85%, až pH roztoku dosáhlo požadované hodnoty. Na závěr se mobilní fáze přefiltrovala přes membránový filtr za podtlaku pomocí vývěvy.

4.4. VALIDACE

Pro validaci byly vybrány podmínky s nejlepší separací: kolona Waters Spherisorb 5 μm Phenyl, 4,6 x 250mm a mobilní fáze o složení acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného (1,4 g/l) v poměru 35:65; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 6,0; průtok 1,0 ml/min, nástřik 20 μl , UV detekce 309 nm, teplota kolony 25 $^{\circ}\text{C}$. Pracovalo se s tabletami s obsahem 100 mg lamotriginu v jedné tabletě, průměrná hmotnost tablety byla 340 mg. Vzorek pro analýzu byl připraven tak, že uvedené tablety byly rozetřeny na homogenní prášek v třence s těrku.

4.4.1. ROBUSTNOST

Při hodnocení robustnosti byly sledovány tyto parametry: změna teploty na koloně, změna pH mobilní fáze a změna poměru pufru a acetonitrilu v mobilní fázi.

4.4.2. LIMIT KVANTIFIKACE PRO PŘÍBUZNÉ LÁTKY

Stanovení LOQ vycházelo z lékopisu [17, 35]. Na základě předchozích experimentů byla odhadnuta koncentrace lamotriginu pro LOQ 1,6 ng/ml. Do 100ml baňky bylo naváženo 0,0158 g lamotriginu a doplněno mobilní fází po rysku (*standard I.*, $c=158\mu\text{g/ml}$). Následně bylo třeba tento roztok zředit 100 000x. 25 μl standardu I. bylo odměřeno do 25ml baňky a doplněno mobilní fází po rysku (*roztok č.2*, $c=158\text{ ng/ml}$); z tohoto roztoku bylo odměřeno 250 μl do 25ml baňky a též doplněno mobilní fází po rysku ($c= 1,58\text{ ng/ml}$). Z chromatogramu roztoku o $c= 1,58\text{ ng/ml}$ jsem vypočítala poměr S/N 5,3; na základě toho jsem vypočítala koncentraci pro LOQ 3,16 ng/ml.

4.4.3. LINEARITA-PŘÍBUZNÉ LÁTKY

Koncentraci lamotriginu odpovídající LOQ (3,16 ng/ml) jsem použila jako nejnižší hodnotu kalibrační přímky. Nejvyšší hodnotu kalibrační přímky jsem zvolila tak, aby odpovídala minimálně 120% povoleného limitu nečistot ve specifikaci léčivé látky nebo léčivého přípravku.

Příprava standardu I: do 100ml baňky bylo naváženo 0,0158 g lamotriginu a doplněno mobilní fází po rysku ($c=158\mu\text{g/ml}$).

Příprava pracovních roztoků: přesně odměřený objem *standardu I* byl v příslušné odměrné baňce doplněn mobilní fází po rysku (Tab. č. 1).

Tabulka č.1 – Příprava pracovních roztoků pro hodnocení linearitu(příbuzné látky)

název	koncentrace (ng/ml)	příprava
Roztok č.1	3,16	100 μl <i>roztoku č.3</i> do 10 ml odměrné baňky
Roztok č.2	158	25 μl <i>standardu I.</i> do 25ml odměrné baňky
Roztok č.3	316	50 μl <i>standardu I.</i> do 25ml odměrné baňky
Roztok č.4	474	75 μl <i>standardu I.</i> do 25ml odměrné baňky
Roztok č.5	632	100 μl <i>standardu I.</i> do 25ml odměrné baňky

4.4.4. LINEARITA-STANOVENÍ OBSAHU

Pro hodnocení linearitu bylo připraveno 5 pracovních roztoků s odstupňovanou koncentrací lamotriginu.

Příprava standardu II: asi 50mg pracovního standardu lamotriginu ($m=0,0514$) bylo naváženo do 25ml odměrné baňky a doplněno mobilní fází po rysku .

Příprava pracovních roztoků: přesně odměřený objem *standardu II* byl v 50ml odměrné baňce doplněn mobilní fází po rysku (Tab. č. 2).

Tabulka č.2 – Příprava pracovních roztoků pro hodnocení linearitu (stanovení obsahu)

název	koncentrace (mg/50 ml)	množství standardu II. v ml
Roztok L1	8,224	4
Roztok L2	9,252	4,5
Roztok L3	10,28	5
Roztok L4	11,308	5,5
Roztok L5	12,336	6

4.4.5. SPRÁVNOST

Pro hodnocení správnosti metody bylo připraveno 6 roztoků s přesným obsahem lamotriginu a přesným obsahem placebo (samotné tabletoviny).

Příprava porovnávacího roztoku a: do 50ml odměrné baňky bylo naváženo asi 10 mg lamotriginu přesně, poté bylo přidáno asi 10 ml mobilní fáze a baňka byla na 10 min vložena do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok doplněn mobilní fází po rysku ($m = 0,01021$ g, $c = 0,0002042$ g/ml = 0,2042 mg/ml).

Příprava pracovních roztoků S1-S6: do 50ml odměrné baňky bylo naváženo asi 10mg lamotriginu přesně a asi 24 mg placebo, poté bylo přidáno asi 10 ml mobilní fáze a baňka byla na 10 min vložena do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok doplněn mobilní fází po rysku. Roztok byl přeplněn do vialky přes filtr. Navážky viz Tab. č.3.

Tabulka č.3 – Příprava pracovních roztoků pro hodnocení správnosti

název	navážka lamotriginu (g)	navážka placebo (g)
Roztok S1	0,01063	0,02645
Roztok S2	0,01050	0,02482
Roztok S3	0,01023	0,02402
Roztok S4	0,01068	0,02403
Roztok S5	0,01030	0,02394
Roztok S6	0,01015	0,02461

4.4.6. PŘESNOST (OPAKOVATELNOST)

Pro hodnocení přesnosti metody bylo připraveno 6 pracovních roztoků z rozetřených tablet.

Příprava porovnávacího roztoku a: do 50ml odměrné baňky bylo naváženo asi 10 mg lamotriginu, poté bylo přidáno asi 10 ml mobilní fáze a baňka byla na 10 min vložena do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok doplněn mobilní fází po rysku ($m = 0,01021$, $c = 0,2042$ mg/ml).

Příprava porovnávacího roztoku b (0,1%): 1 ml *porovnávacího roztoku a* (viz předchozí) byl odměřen do 50 ml baňky a doplněn mobilní fází po rysku, z tohoto roztoku bylo odměřeno 2,5 ml do 50ml baňky a opět doplněno mobilní fází po rysku.

Příprava pracovních roztoků P1-P6: do 50ml odměrné baňky bylo naváženo asi 34 mg rozdrcených tablet, což odpovídá 10 mg lamotriginu, poté bylo přidáno asi 10 ml mobilní fáze a baňka byla na 10 min vložena do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok doplněn mobilní fází po rysku. Roztok byl přeplněn do vialky přes filtr. Navážky viz Tab č. 4.

Tabulka č.4 – Příprava pracovních roztoků pro hodnocení přesnosti

název	navážka tabletoviny s obsahem lamotriginu (g)
Roztok P1	0,0341
Roztok P2	0,0348
Roztok P3	0,0340
Roztok P4	0,0352
Roztok P5	0,0356
Roztok P6	0,0346

4.4.7. SELEKTIVITA-STANOVENÍ OBSAHU

Pro hodnocení selektivity metody při stanovení obsahu účinné látky byly použity roztoky: *standard, reálný vzorek, modelový vzorek a blank*.

Příprava vzorků:

Standard: do 50ml odměrné baňky bylo naváženo asi 10 mg lamotriginu, poté bylo přidáno asi 10 ml mobilní fáze a baňka byla na 10 min vložena do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok doplněn mobilní fází po rysku.

Reálný vzorek: do 50ml odměrné baňky bylo naváženo asi 34 mg rozdrcených tablet s obsahem lamotriginu, poté bylo přidáno asi 10 ml mobilní fáze a baňka byla na 10 min vložena do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok doplněn mobilní fází po rysku. Roztok byl přeplněn do vialky přes filtr.

Modelový vzorek: do 50ml odměrné baňky bylo naváženo asi 10 mg lamotriginu a asi 24 mg placebo, poté bylo přidáno asi 10 ml mobilní fáze a baňka byla na 10 min vložena do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok doplněn mobilní fází po rysku. Roztok byl přeplněn do vialky přes filtr.

Blank: do 50ml odměrné baňky bylo naváženo asi 24 mg placebo, poté bylo přidáno asi 10 ml mobilní fáze a baňka byla na 10 min vložena do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok doplněn mobilní fází po rysku. Roztok byl přeplněn do vialky přes filtr.

4.4.8. SELEKTIVITA-PŘÍBUZNÉ LÁTKY

Pro hodnocení selektivity metody při stanovení příbuzných látek byl použity stejné roztoky jako pro hodnocení selektivity u stanovení obsahu lamotriginu.

Příprava vzorků: viz předchozí

4.4.9. TEST ZPŮSOBILOSTI SYSTÉMU

Stanovení obsahu: hodnotily se parametry: počet teoretických pater (t.plate), faktor symetrie píku (tailing faktor) a relativní směrodatná odchylka z 5 nástřiků pro pík lamotriginu v porovnávacím roztoku pro stanovení obsahu lamotriginu (*porovnávací roztok a*).

Příbuzné látky: hodnotily se parametry počet: teoretických pater (t.plate), faktor symetrie píku (tailing faktor) a relativní směrodatná odchylka z 3 nástřiků pro pík lamotriginu v porovnávacím roztoku pro hodnocení čistoty lamotriginu (*porovnávací roztok b*).

Příprava porovnávacích roztoků: viz kapitola 4.4.6. PŘESNOST

4.5. ZÁVISLOST OBSAHU PŘÍBUZNÝCH LÁTEK NA DOBĚ VAŘENÍ LAMOTRIGINU

Asi 10mg lamotriginu bylo naváženo do varné baňky ($m=0,0120$) a následně bylo přidáno 60ml vody. Baňka byla umístěna na vodní lázeň pod zpětný chladič a roztok se vařil po stanovený čas (0-8 hodin). V hodinových intervalech byly odebírány vzorky, které byly následně analyzovány. Zjišťovala se závislost mezi dobou vaření lamotriginu a obsahem jeho příbuzných látek.

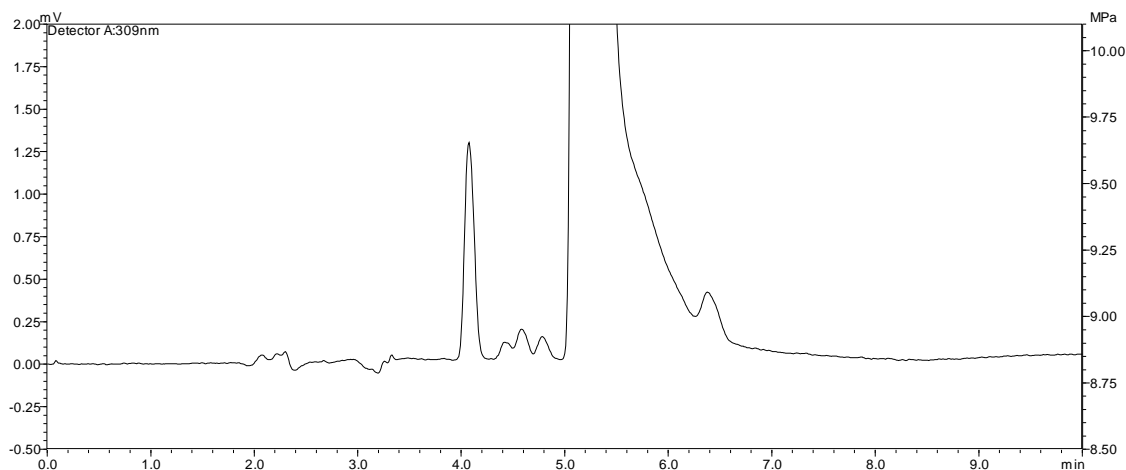
5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK

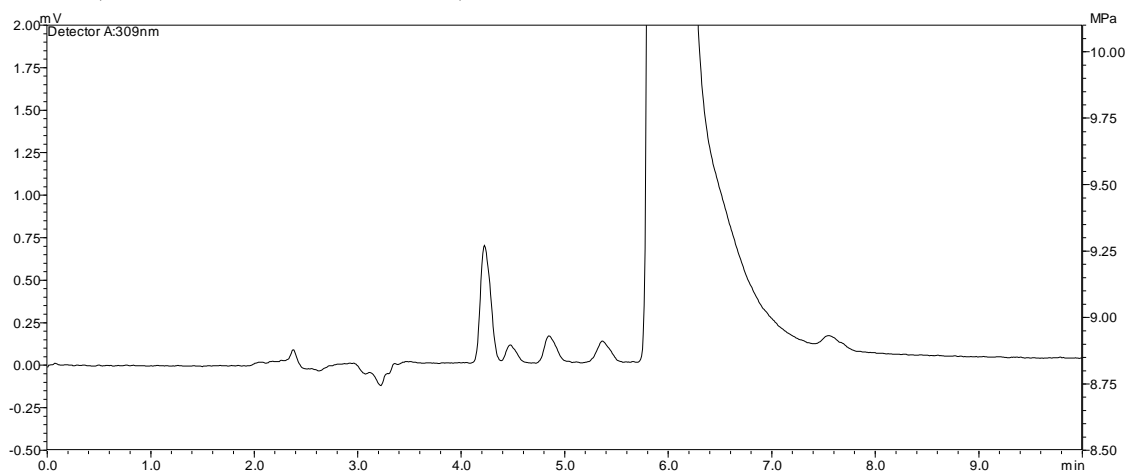
Kolona č.1: Waters Spherisorb 5 µm Phenyl, 4,6 x 250mm

U mobilní fáze č. 1 se na chromatogramu objevily čtyři malé píky, následně lamotrigin a za ním další malý pík (separovaly se čtyři nečistoty, následně lamotrigin a další nečistota). Píky ovšem nebyly rozděleny až na základní linii a pík lamotriginu výrazně chvostoval (*obr.č.2*). Při změně poměru acetonitrilu a pufru byla separace přibližně stejná jako u mobilní fáze č.1. Při snížení pH na hodnotu 6 (mobilní fáze č.3) byla separace jednotlivých píků lepší a pík lamotriginu méně chvostoval (*obr.č.3*). Při dalším snížení pH na hodnotu 5 (mobilní fáze č.5) byly separovány čtyři nečistoty a následně lamotrigin. Za lamotriginem se už však žádný pík nečistoty nevymyl.

Obr.č.2 (kolona č.1, mobilní fáze č.1)



Obr.č.3 (kolona č.1, mobilní fáze č.3)

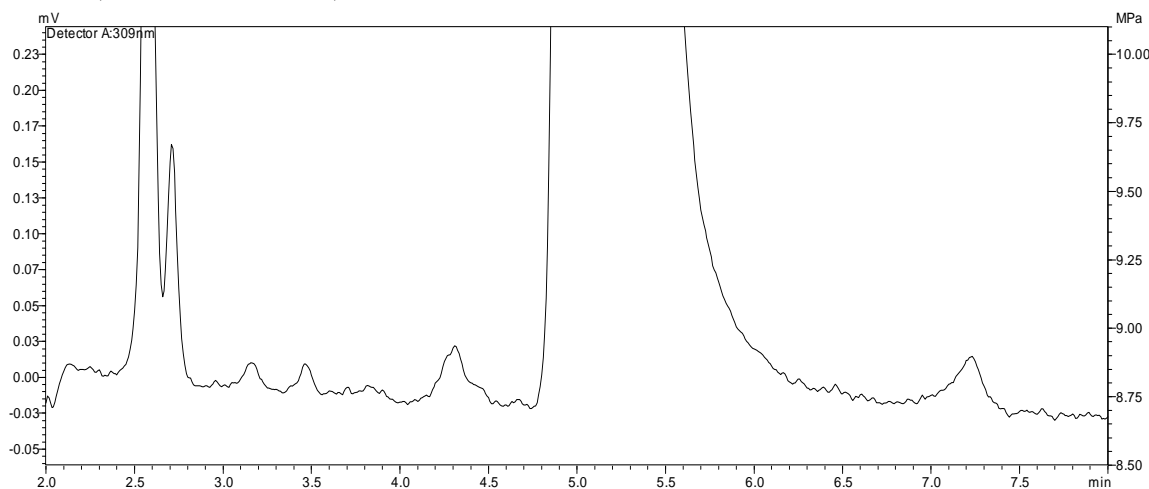


Kolona č.2: Discovery HS F5 5 μm , 15cm x 4,6 mm, SLO70613BQP

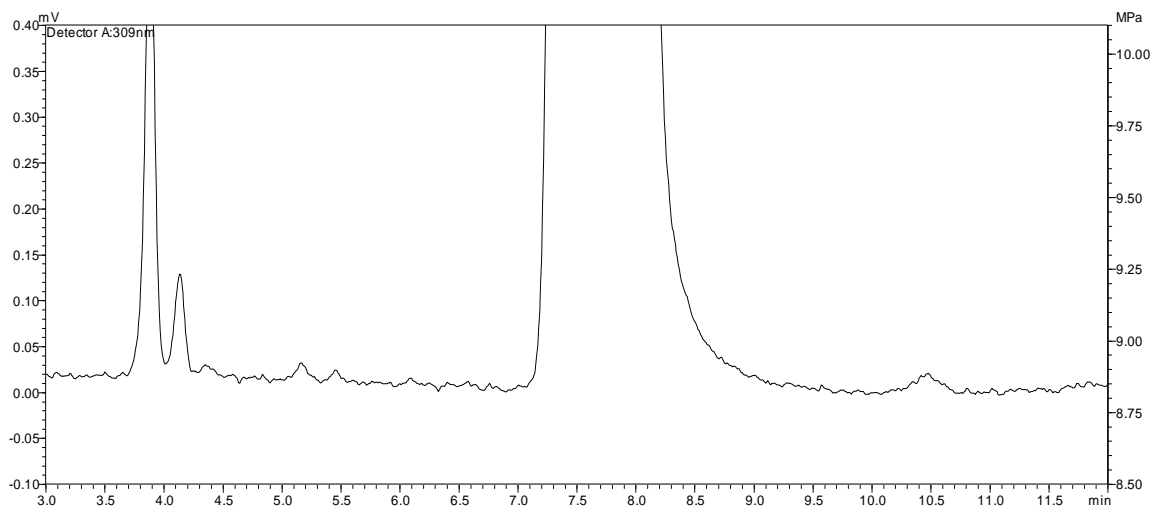
Předkolona: Discovery HS C18, 2cm x 2,1 mm, 5 μm KIT

U mobilní fáze č.1 se na chromatogramu vyskytl pouze jeden pík nečistoty a lamotrigin. Při snížení pH na hodnotu 4 a 3 se separovaly dva píky nečistot a následně lamotrigin. Při zvýšení pH na hodnotu 6 se nejdříve separovaly dva píky nečistot, lamotrigin a hned za ním malý pík třetí nečistoty a následně ještě čtvrtá nečistota. Při pH 5 se malý pík nečistoty těsně za lamotriginem přesunul těsně před něj. Toto pH se jeví jako nejvýhodnější. Zvýšením množství acetonitrilu ve směsi vedlo k tomu, že se na chromatogramu před píkem lamotriginu vyskytly ještě další, ovšem velmi malé píky (*obr.č.4*). Při pH 4,9 a 5,1 byly chromatogramy téměř shodné jako při použití mobilní fáze o pH 5. Při přidání pufru se prodloužil retenční čas a také rozlišení píků prvních dvou nečistot bylo nejlepší, téměř ale vymizely malé píky těsně před lamotriginem (*obr.č.5*). Při zvýšení pH na hodnotu 5,2 se separace malých píků před lamotriginem mírně zlepšila (*obr.č.6*).

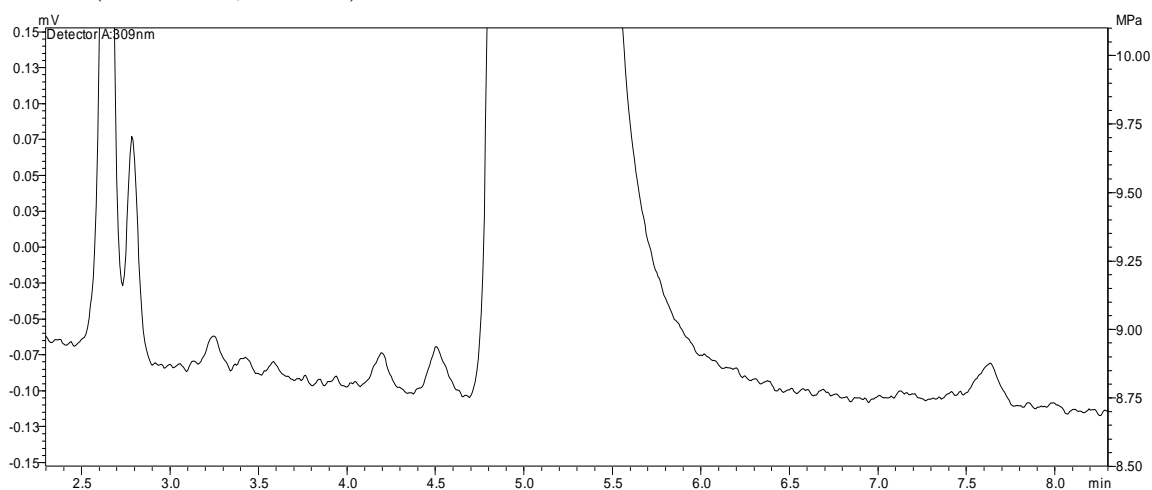
Obr.č.4 (kolona č.2. mf č.6)



Obr.č.5 (kolona č.2, mf č.9)



Obr.č.6 (kolona č.2, mf č.10)



Separace nečistot u obou kolon byla přibližně stejná, phenylovou kolonu jsme k validaci vybrali proto, že pík lamotriginu byl štíhlejší a symetričtější, také počet teoretických pater byl vyšší.

5.2. VALIDACE

Pro validaci byla vybrána kolona Waters Spherisorb 5 μ m Phenyl, 4,6 x 250mm a mobilní fáze o složení acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 35:65; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 6,0. Za těchto podmínek byla separace lamotriginu a jeho rozkladných produktů nejlepší (*obr.č.3*).

5.2.1. ROBUSTNOST

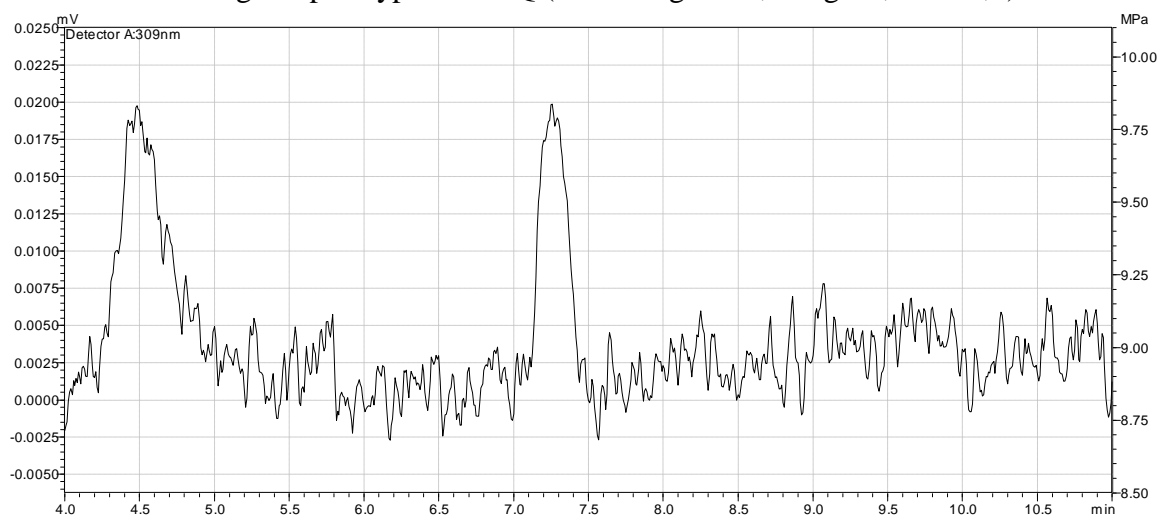
Snížení teploty z 40°C na 25°C nemělo na separaci významný vliv, stejně tak změna pH o 0,1. Při zvýšení množství pufru se prodlouží retenční časy a separace dvou píků nečistot před píkem lamotriginu je lepší, ovšem vymizí malý pík za lamotriginem. Při zvýšení množství acetonitrilu se sníží retenční časy, separace prvních dvou nečistot se zhorší a vymizí malý pík za lamotriginem.

Lze tedy konstatovat, že je třeba zvlášť dbát na dodržování správného poměru acetonitril pufr v mobilní fázi.

5.2.2. LIMIT KVANTIFIKACE PRO PŘÍBUZNÉ LÁTKY

Na základě předchozích experimentů byla odhadnuta koncentrace lamotriginu pro LOQ 1,6 ng/ml. Byl připraven roztok o koncentraci 1,58 ng/ml a následně byla z jeho chromatogramu vypočítána hodnota S/N ($S/N = 2H/h = 2 \cdot 69/26 = 5,3$). Hodnota S/N pro LOQ se udává 10, proto je tedy potřeba použít dvojnásobnou koncentraci roztoku. Byl tedy připraven roztok o koncentraci 3,16 ng/ml, jehož koncentrace odpovídá LOQ.

Obr.č.7: chromatogram pro výpočet LOQ (c lamotriginu=1,58 ng/ml, S/N=5,3)



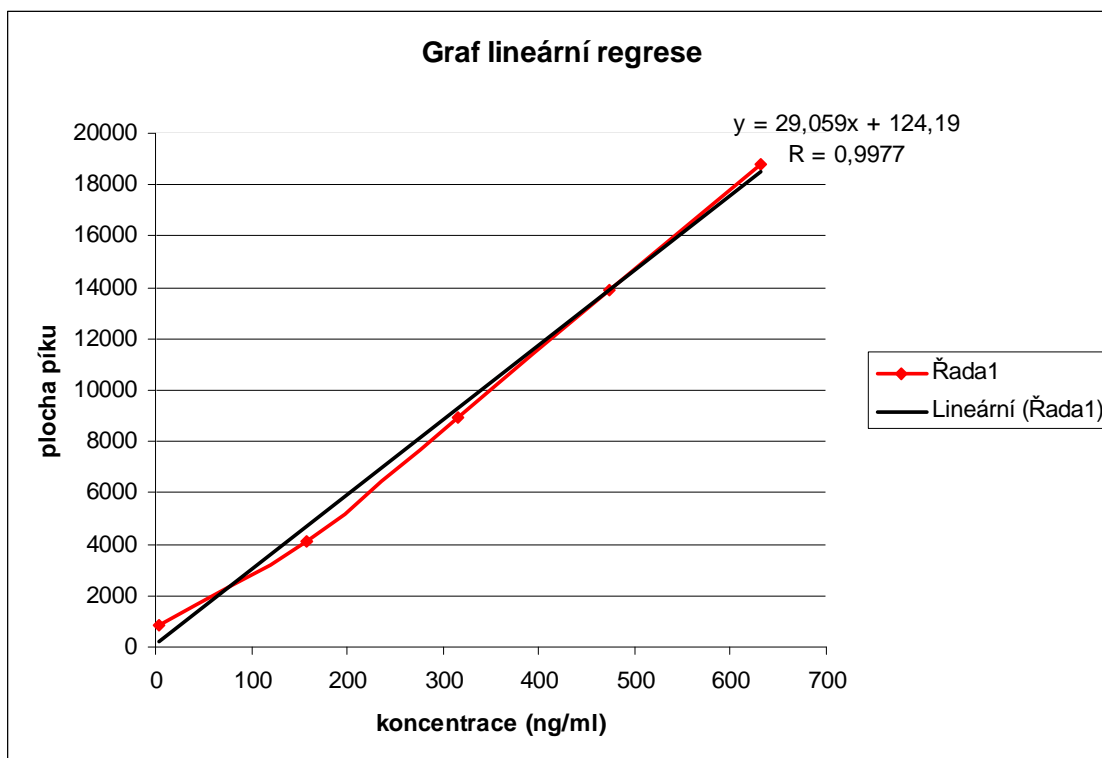
5.2.3. LINEARITA-PŘÍBUZNÉ LÁTKY

Pro zjištění lineární závislosti bylo proměřeno 5 pracovních roztoků pro kalibraci s odstupňovanou koncentrací lamotriginu od 3,16 ng/ml do 632 ng/ml. Spodní hodnota kalibrační přímky odpovídá LOQ. Lineární závislost byla prokázána. Naměřený korelační koeficient linearity (0,9977) vyhovuje požadavku, který udává, že hodnota nesmí klesnout pod 0,99.

Tabulka č.5 – Linearita (příbuzné látky)

c lamotriginu (ng/ml)	plocha píku
3,16	839,3
158	4143
316	8917,7
474	13912,7
632	18812,7

Graf č.1 – Linearita (příbuzné látky)



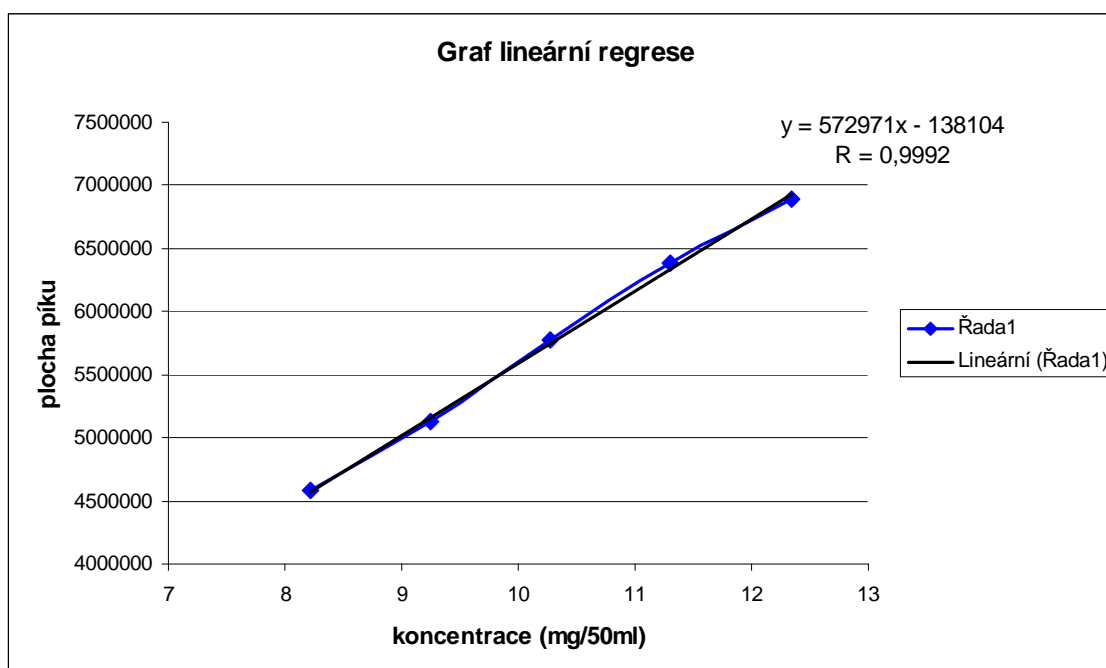
5.2.4. LINEARITA-STANOVENÍ OBSAHU

Pro zjištění lineární závislosti bylo proměřeno 5 pracovních roztoků pro kalibraci s odstupňovanou koncentrací lamotriginu od 8,224 mg/50 ml do 12,336 mg/50 ml. Lineární závislost byla prokázána. Naměřený korelační faktor linearity (0,9992) vyhovuje požadavku, který udává, že hodnota nesmí klesnout pod 0,999.

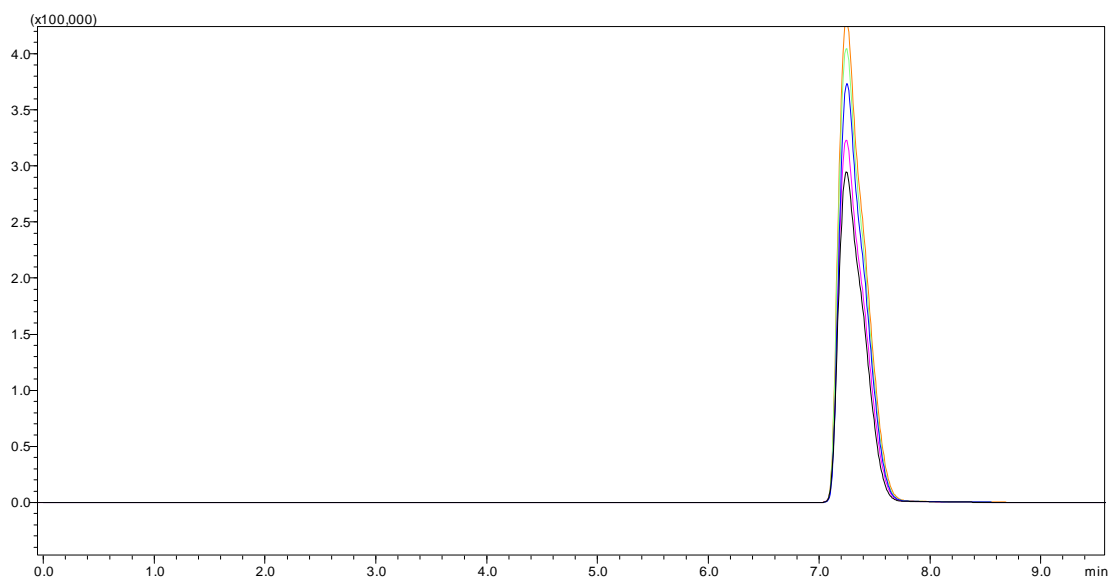
Tabulka č.6 – Linearita (stanovení obsahu)

	c lamo (mg/50ml)	ret.čas	plocha píku	tailing.f.	t.plate	průměr ploch píků
L101	8,224	7.415	4577910	1.793	4351.988	4579215
L102		7.414	4580652	1.807	4257.456	
L103		7.413	4579083	1.826	5167.095	
L201	9,252	7.407	5120251	1.850	4040.500	5123208
L202		7.388	5125564	1.850	5035.284	
L203		7.280	5123809	1.840	5241.443	
L301	10,280	7.247	5779978	1.867	4998.015	5780059,3
L302		7.248	5780150	1.869	5014.489	
L303		7.247	5780050	1.872	5085.937	
L401	11,308	7.242	6384217	1.877	3805.735	6383658,7
L402		7.243	6383180	1.884	4902.075	
L403		7.246	6383579	1.890	4952.728	
L501	12,336	7.242	6894520	1.905	4805.297	6894062
L502		7.243	6894035	1.909	4867.923	
L503		7.243	6893631	1.917	4932.522	

Graf č.2 – Linearita (stanovení obsahu)



Obr.č.8 – Linearita (stanovení obsahu)



černý chromatogram: koncentrace lamotriginu 8,224 mg/50ml

růžový chromatogram: koncentrace lamotriginu 9,252 mg/50ml

modrý chromatogram: koncentrace lamotriginu 10,28 mg/50ml

zelený chromatogram: koncentrace lamotriginu 11,308 mg/50ml

oranžový chromatogram: koncentrace lamotriginu 12,336 mg/50ml

5.2.5. SPRÁVNOST

Pro hodnocení správnosti metody bylo proměřeno 6 vzorků s přesným obsahem lamotriginu a přesným obsahem placebo (samotné tabletoviny).

Výpočty:

Skutečná (správná) koncentrace lamotriginu (mg/ml):

$(\text{navážka lamotriginu} / 50) * 1000$

Stanovená koncentrace lamotriginu (mg/ml):

$(\text{plocha píku roztoku S1 až S6} / \text{plocha píku porov.roztoku a}) * \text{konc. porov.roztoku a}$
(0,2042 mg/ml)

*Recovery: (stanovená koncentrace / skutečná koncentrace) * 100*

Tabulka č.7 - Správnost

	navážka lamo	navážka placebo	skutečná konc.(mg/ml)	plocha píku	stanovená konc.(mg/ml)	recovery
porovnávací roztok a	0,01021			5559439		
roztok S1	0,01063	0,02645	0,2126	5734249	0,2106	99,07
roztok S2	0,01050	0,02482	0,2100	5701385	0,2094	99,72
roztok S3	0,01023	0,02402	0,2046	5601225	0,2057	100,54
roztok S4	0,01068	0,02403	0,2136	5879087	0,2159	101,08
roztok S5	0,01030	0,02394	0,2060	5655161	0,2078	100,89
roztok S6	0,01015	0,02461	0,2030	5582672	0,2052	101,07
					průměr	100,39

Recovery (výtěžnost) je 100,4 %, RSD je 0,82 %. Uvedené hodnoty vyhovují normě, která udává recovery v rozmezí 98-102 %, RSD do 2 %.

5.2.6. PŘESNOST (OPAKOVATELNOST)

Pro hodnocení přesnosti metody bylo proměřeno 6 pracovních roztoků pro přesnost a porovnávací roztok.

Výpočty:

$$\% \text{ obsah} = \frac{\text{plocha píku vz.} \cdot \text{nav. por.roztoku a} \cdot \text{st.purity (99,9)} \cdot \text{prům.hmotnost tbl (340 mg)}}{\text{plocha píku por.roztoku a} \cdot \text{navážka tabletoviny} \cdot \text{deklar.obsah lamotriginu (100 mg)}}$$

Tabulka č.8 – Přesnost

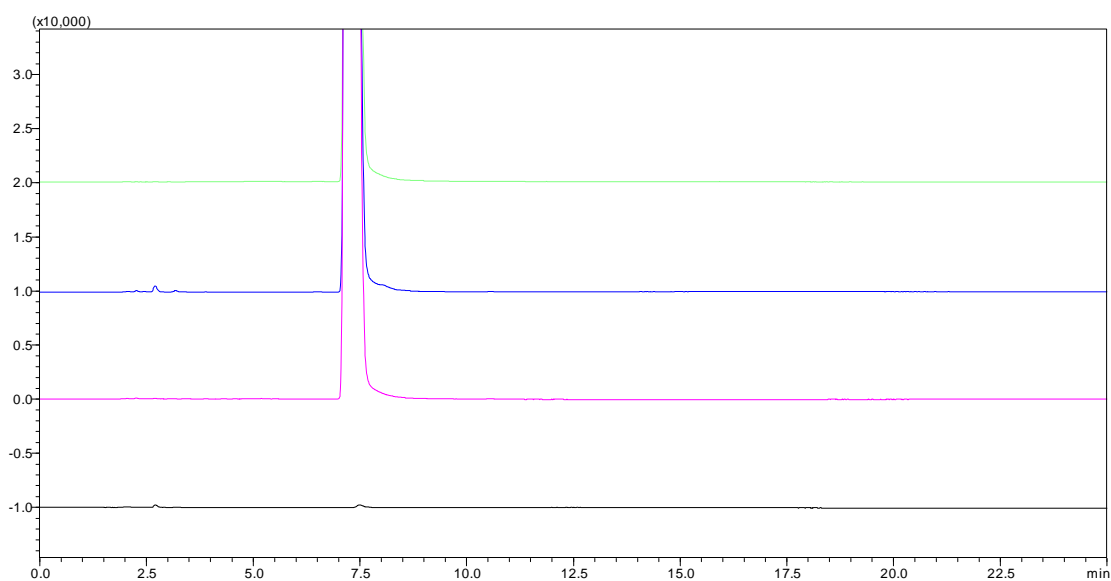
	navážka	plocha píku	% obsah lamotriginu
porovnávací roztok a	0,01021	5556123	
roztok P1	0,0341	5443754	99,64
roztok P2	0,0348	5472184	98,15
roztok P3	0,0340	5384475	98,87
roztok P4	0,0352	5590152	99,15
roztok P5	0,0356	5657035	99,05
roztok P6	0,0346	5451923	98,22
		průměr	98,85

Průměrný obsah lamotriginu v tabletě je 98,85 % uvedeného obsahu účinné látky. Relativní směrodatná odchylka (RSD) je 0,58 %, což vyhovuje uvedené normě (RSD do 2 %).

5.2.7. SELEKTIVITA-STANOVENÍ OBSAHU

Při hodnocení selektivity metody pro stanovení obsahu byly hodnoceny chromatogramy standardu, reálného vzorku a modelového vzorku. Z níže uvedených chromatogramů je patrné, že s píkem lamotriginu neinterferuje žádná jiná látka, metoda pro stanovení obsahu lamotriginu je tedy selektivní.

Obrázek č.9 – Selektivita (stanovení obsahu)

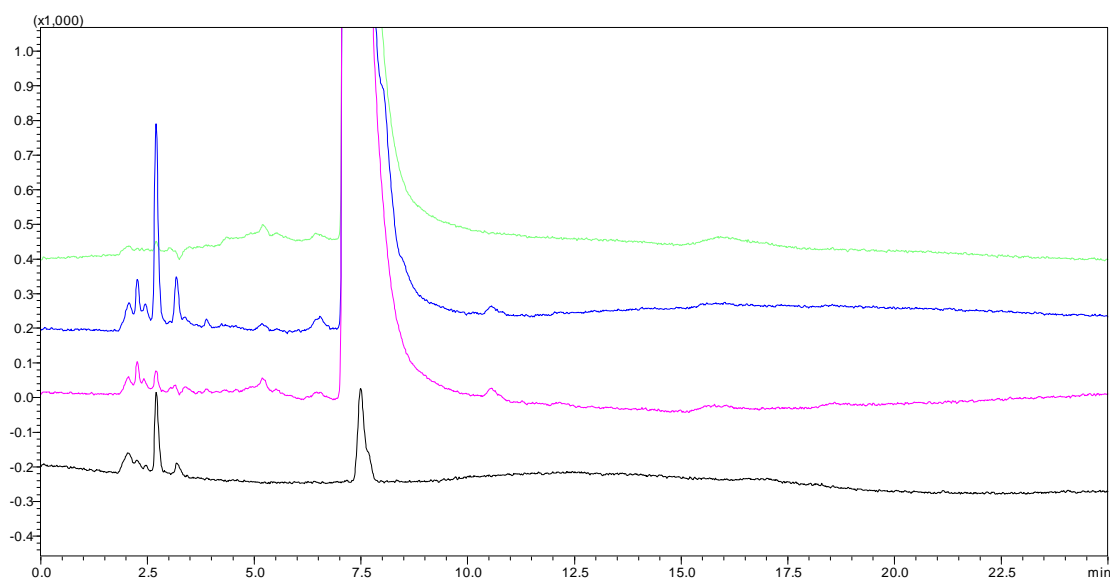


zelená - standard lamotriginu
modrá - reálný vzorek
růžová - modelový vzorek
černá - blank-tj.tabletovina bez lamotriginu

5.2.8. SELEKTIVITA-PŘÍBUZNÉ LÁTKY

Při hodnocení selektivity metody pro stanovení příbuzných látek byly hodnoceny chromatogramy standardu, reálného vzorku a modelového vzorku. Z níže uvedených chromatogramů je patrné, že s píky nečistot neinterferuje žádná jiná látka, metoda pro stanovení příbuzných látek je tedy selektivní. Pík lamotriginu v blanku se objevoval i při opakovaných pokusech a zřejmě bylo placebo kontaminováno stopami lamotriginu. Jiná směs placebo k dispozici nebyla.

Obrázek č.10– Selektivita (příbuzné látky)



zelená - standard lamotriginu
modrá - reálný vzorek
růžová - modelový vzorek
černá - blank – tj. tabletovina bez lamotriginu

5.2.9. TEST ZPŮSOBILOSTI SYSTÉMU

Stanovení obsahu: nastříkne se 5 x *porovnávací roztok a*. Průměrná hodnota počet teoretických pater (t.plate) je 5660, pro tuto metodu tedy navrhuji hodnotu 4500. Faktor symetrie píku (tailing faktor) je 1,37, lékopis udává hodnoty 0,8-1,5. Relativní směrodatná odchylka je 0,05% (udává se hodnota do 2%).

Příbuzné látky: nastříkne se 3 x *porovnávací roztok b*. Průměrná hodnota počet teoretických pater (t.plate) je 6198, pro tuto metodu tedy navrhuji hodnotu 5000. Faktor symetrie píku (tailing faktor) je 1,37, lékopis udává hodnoty 0,8-1,5. Relativní směrodatná odchylka je 0,92% (udává se hodnota do 4%).

5.3. VYPRACOVANÁ METODA PRO HODNOCENÍ LAMOTRIGINU A JEHO PŘÍBUZNÝCH LÁTEK V TABLETÁCH

Příprava zkoušeného roztoku: z rozetřených tablet se do 50ml odměrné baňky naváží tolik tabletového prášku, kolik odpovídá 10 mg lamotriginu, přidá se 10 ml mobilní fáze a vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně. Po ochlazení se roztok doplní mobilní fází po rysku, promíchá se a zfiltruje přes membránový filtr do vialky.

Příprava porovnávacího roztoku a: k přesně asi 10 mg pracovního standardu se v 50ml odměrné baňce přidá 10 ml mobilní fáze a vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně. Poté se roztok doplní mobilní fází po rysku.

Příprava porovnávacího roztoku b: 1,0 ml *porovnávacího roztoku a* se v odměrné baňce na 50 ml doplní po značku mobilní fází a promíchá se. 2,5 tohoto roztoku se v odměrné baňce na 50 ml doplní po značku mobilní fází a opět promíchá (0,1%).

Kolona:

- *rozměry:* délka 250 mm, vnitřní průměr 4,6 mm

- *stacionární fáze:* silikagel pro chromatografii fenylsilylovaný (5 μ m), např. Waters Spherisorb 5 μ m Phenyl, 4,6 x 250mm

Mobilní fáze: směs objemových dílů acetonitrilu, pufru hydrogenfosforečnanu didraselného (1,4 g/l) v poměru 35:65; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 6,0

Průtoková rychlost: 1,0 ml/min

Detekce: spektrofotometrický detektor, 309nm

Nástřik: 20 μ l; zkoušený roztok, *porovnávací roztok a* a *porovnávací roztok b*

Teplota kolony: 25°C

Doba záznamu: eluuje se nejméně trojnásobek retenčního času lamotriginu

Retenční čas: lamotrigin asi 7,5 min.

Test způsobilosti:

Pro stanovení obsahu:

- počet teoretických pater pro *porovnávací roztok a* ≥ 4500

- faktor symetrie píku 0,8-1,5

- relativní směrodatná odchylka z pěti nástřiků *porovnávacího roztoku a* $\leq 2,0\%$

Pro hodnocení příbuzných látek:

- počet teoretických pater pro *porovnávací roztok* **b** ≥ 5000
- faktor symetrie píku 0,8-1,5
- relativní směrodatná odchylka ze tří nástřiků *porovnávacího roztoku* **b** $\leq 4,0\%$

Limity: limity pro jednotlivé nečistoty a pro sumu nečistot je u přípravku nutno teprve definovat. Na této úrovni lze jen konstatovat, že limit zanedbatelnosti je 0,02 násobek plochy hlavního píku na chromatogramu *porovnávacího roztoku* **b** (0,002 %).

Výpočty:

$$\% \text{ obsah} = \frac{\text{plocha píku zk. roztoku} * \text{nav. por.roztoku } \mathbf{a} * \text{st.purity (\%)} * \text{prům.hmotnost tbl (mg)}}{\text{plocha píku por. roztoku } \mathbf{a} * \text{nav. tabletoviny (mg)} * \text{deklar.obsah lamotriginu (mg/tbl)}}$$

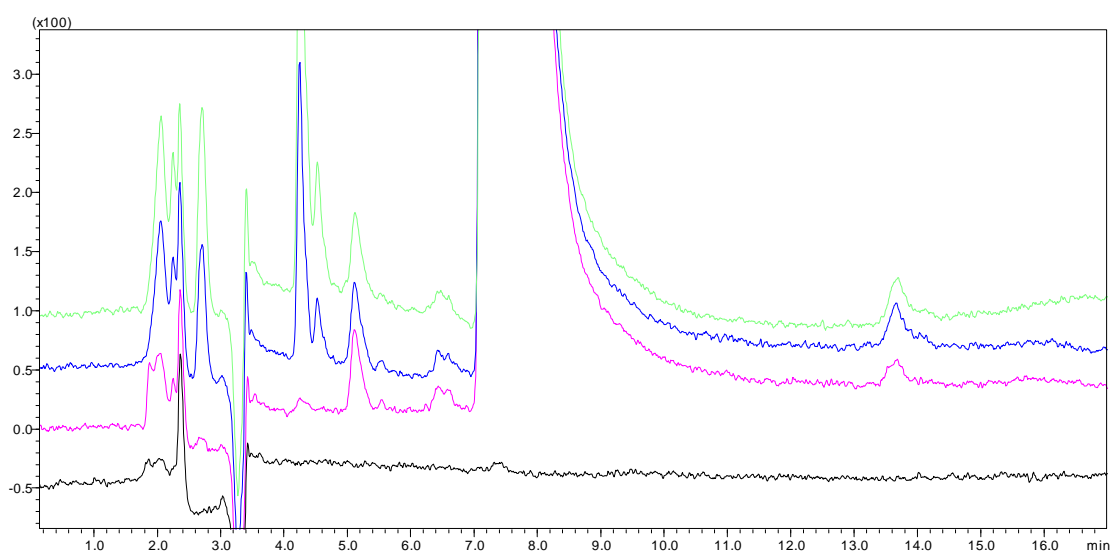
5.4. ZÁVISLOST OBSAHU PŘÍBUZNÝCH LÁTEK NA DOBĚ VAŘENÍ LAMOTRIGINU

Nečistota **Imp.3** a nečistota **Imp.4** byly přítomny i ve vzorku nevařeném (0 hod). Množství nečistoty **Imp.3** i nečistoty **Imp.4** bylo po celou dobu varu vzorku téměř konstantní, lze tedy konstatovat, že tyto 2 nečistoty pravděpodobně nejsou rozkladné produkty.

Po jedné hodině varu se na chromatogramu vyskytl pík označený **Imp.1**. Množství nečistoty **Imp.1** se vzrůstající délkou varu vzorku výrazně rostlo.

Po dvou hodinách varu se na chromatogramu vyskytl další pík označený **Imp.2**. Množství nečistoty **Imp.2** se vzrůstající délkou varu vzorku mírně rostlo.

Obrázek č.11- vzorky s obsahem lamotriginu vystavené varu

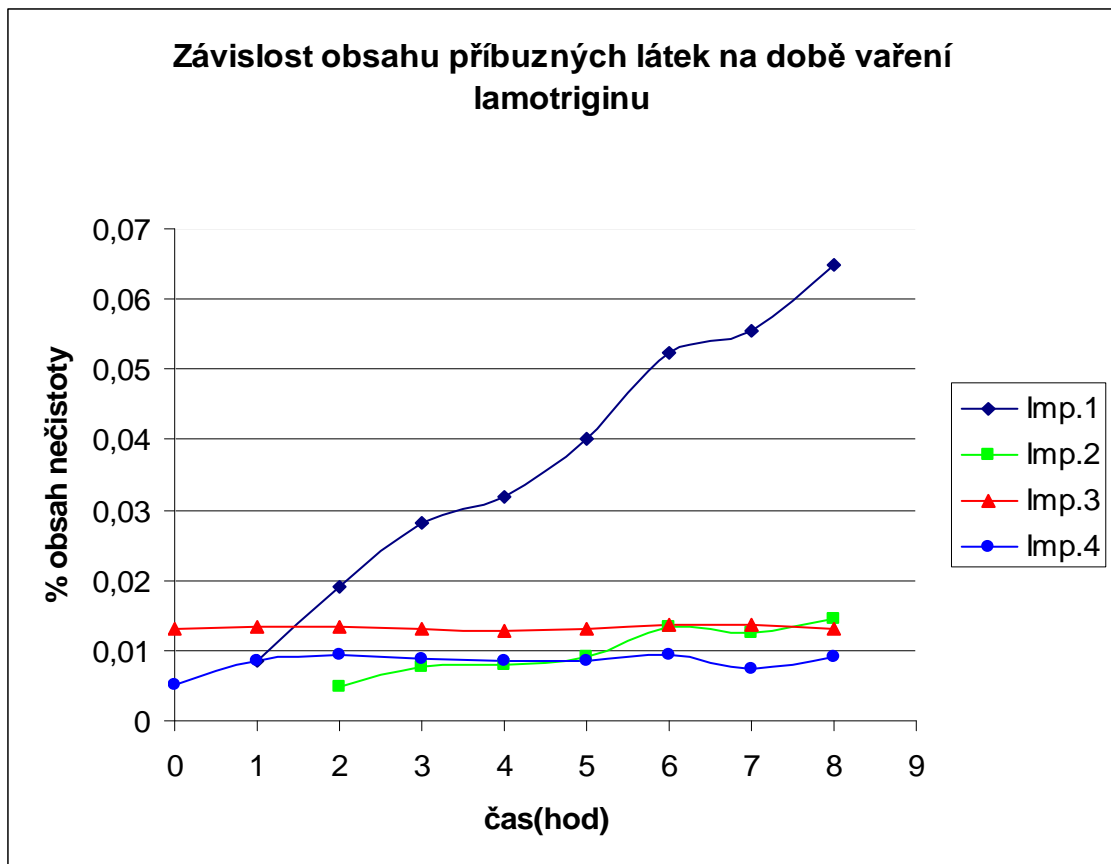


černá - voda
růžová - vzorek vařený 0 hodin (nevařený)
modrá - vzorek vařený 4 hodiny
zelená – vzorek vařený 8 hodin

Tabulka č.9 – Závislost obsahu příbuzných látek na době vaření lamotriginu

délka varu		plocha píku	% obsah
0 hodin	<i>Imp.3</i>	739,5	0,0130
	lamotrigin	5706808	
	<i>Imp.4</i>	289,5	0,0051
1 hodina	<i>Imp.1</i>	490,5	0,0086
	<i>Imp.3</i>	762	0,0133
	lamotrigin	5719371	
2 hodiny	<i>Imp.4</i>	485	0,0085
	<i>Imp.1</i>	1120	0,0191
	<i>Imp.2</i>	272	0,0047
3 hodiny	<i>Imp.3</i>	785,5	0,0134
	lamotrigin	5849333	
	<i>Imp.4</i>	554,5	0,0095
	<i>Imp.1</i>	1655	0,0283
	<i>Imp.2</i>	450,5	0,0077
4 hodiny	<i>Imp.3</i>	759	0,0130
	lamotrigin	5844440,5	
	<i>Imp.4</i>	516,5	0,0088
	<i>Imp.1</i>	1885,5	0,0319
	<i>Imp.2</i>	471	0,0080
5 hodiny	<i>Imp.3</i>	756,5	0,0128
	lamotrigin	5903903,5	
	<i>Imp.4</i>	501,5	0,0085
	<i>Imp.1</i>	2356,5	0,0401
	<i>Imp.2</i>	527	0,0090
6 hodiny	<i>Imp.3</i>	773	0,0132
	lamotrigin	5873087	
	<i>Imp.4</i>	496	0,0084
	<i>Imp.1</i>	2865,5	0,0524
	<i>Imp.2</i>	736,5	0,0135
7 hodiny	<i>Imp.3</i>	747,5	0,0137
	lamotrigin	5468948	
	<i>Imp.4</i>	508,5	0,0093
	<i>Imp.1</i>	3271	0,0556
	<i>Imp.2</i>	731	0,0124
8 hodiny	<i>Imp.3</i>	808,5	0,0137
	lamotrigin	5885965	
	<i>Imp.4</i>	431	0,0073
	<i>Imp.1</i>	3809	0,0650
	<i>Imp.2</i>	850,5	0,0145
8 hodiny	<i>Imp.3</i>	775,5	0,0132
	lamotrigin	5858938	
	<i>Imp.4</i>	526,5	0,0090

Graf č.3 - Závislost obsahu příbuzných látek na době vaření lamotriginu



Podle výsledků z tepelné zátěže lamotriginu ve vodném roztoku lze tedy konstatovat, že nečistoty *Imp.1* a *Imp.2* jsou rozkladné produkty lamotriginu.

6. ZÁVĚR

1. Byly zpracovány literární zdroje týkající se vysokoúčinné kapalinové chromatografie, problematiky validace, lamotriginu a jeho hodnocení z hlediska čistoty.

2. Byly optimalizovány chromatografické podmínky pro hodnocení lamotriginu a jeho příbuzných látek v přípravku typu tablet. Byla vybrána chromatografická kolona Waters Spherisorb 5 μ m Phenyl, 4,6 x 250mm a mobilní fáze o složení acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného v poměru 35:65; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 6,0.

3. Metoda byla validována:

Byla prozkoušena linearita metody. Při stanovení příbuzných látek byla prokázána lineární závislost v koncentracích lamotriginu od 3,16 ng/ml do 632 ng/ml, $R = 0,9977$. Při stanovení obsahu byla prokázána lineární závislost v koncentracích lamotriginu od 8,224 mg/50 ml do 12,336 mg/50 ml, $R = 0,9992$.

Byla zkoušena správnost metody. Průměrná recovery je 100,4 %, RSD je 0,82 %.

Byla ověřena přesnost metody. RSD je 0,58 %, uvedená hodnota vyhovuje normě ($RSD \leq 2$).

Byla ověřena selektivita metody.

Byla stanovena hodnota LOQ -asi 3 ng/ml.

Metoda je robustní ke změnám pH mobilní fáze $\pm 0,1$ jednotky pH a k teplotě na koloně (od 25°C do 40°C), je však třeba dodržovat poměr acetonitril - pufr v mobilní fázi.

Byl definován test způsobilosti chromatografického systému.

4. Byla prokázána závislost mezi dobou vaření lamotriginu a obsahem jeho příbuzných látek.

7. LITERATURA

- [1] Klimeš, J. a kol. *Kontrola léčiv I.*. Karolinum, Praha, 2006
- [2] <http://web.natur.cuni.cz>, dostupné z <http://web.natur.cuni.cz/~tesarove/hplc.pdf>
- [3] Lincová, D., Farghali, H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galen, Praha, 2007
- [4] Karlíček, R. a kol. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Karolinum, Praha, 2005
- [5] Klouda, P. *Moderní analytické metody*. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, 2003
- [6] Volka, K. a kol. *Analytická chemie II*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 1995
- [7] Štulík, K. a kol. *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha, 2004
- [8] Klimeš, J. a kol. *Kontrola léčiv II.*. Karolinum, Praha, 2004
- [9] <http://web.natur.cuni.cz>, dostupné z <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [10] Topková Kateřina. *Diplomová práce: Hodnocení vybrané nečistoty v přípravku (Stanovení obsahu imidazolu pomocí HPLC)*. Hradec Králové, 2008
- [11] www.encyklopedie.seznam.cz, poslední revize 1.12.2007, dostupné z <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/538352-kapalinova-chromatografie>
- [12] Douša, M. www.hplc.cz, poslední revize 5.9.2008
- [13] www.sisw.cz, dostupné z <http://sisw.cz/sisw/cz-prodetail.php?pn=28-0722&gclid=CMb02uaN3ZoCFQsJ3wodwGc43A>
- [14] www.chromspec.com, dostupné z <http://www.chromspec.com/pdf/lit/rk96.pdf>
- [15] www.sigmaaldrich.com, dostupné z http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/11300/Novinky_1_2003.pdf
- [16] Bezáková, Ž. *Analýza chemických léčiv - stanovenie obsahu léčiv podľa Slovenského liekopisu I*. VA Print, Nitra, 2000
- [17] Český lékopis 2005 (ČL 2005). Grada, Praha, 2005
- [18] Český lékopis 2002 (ČL 2002). Grada, Praha, 2002
- [19] www.wikipedia.org, poslední revize 30.9.2008, dostupné z <http://en.wikipedia.org/wiki/Lamotrigine>
- [20] Pharmazeutische Stoffliste 12. Auflage. L. ABDA, Eschborn, 2001
- [21] www.psychiatriepropraxi.cz, Solen s.r.o. 2005, dostupné z <http://www.psychiatriepropraxi.cz/pdfs/psy/2004/03/04.pdf>

- [22] Silbernagl, S., Lang, F. *Atlas patofyziologie člověka*, Grada, Praha, 2001
- [23] Hynie, S. *Speciální farmakologie. Díl 3, Látky ovlivňující CNS*, Karolinum, Praha, 2000
- [24] Souhrn SPC: 17142, AISLP WIN ČR
- [25] Souhrn SPC: 19966, AISLP WIN ČR
- [26] Článek: 19966, AISLP WIN ČR
- [27] *A method of testing the purity or stability of 'lamotrigine' with the use of a 1,2,4-triazine derivative as reference marker*, European Patent EP1170588, publikováno 2002, dostupné z www.freepatentsonline.com/EP1170588A1.html
- [28] Hewitt, E.F., Lukulay, P., Galusko, S. *Implementation of a rapid and automated high performance liquid chromatography method development strategy for pharmaceutical drug candidates*, Journal of Chromatography A, 2006
- [29] J. 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, March 2006
- [30] Addolorata Saracino Maria, Bugamelli Francesca, Conti Matteo, Aore Mario, Augusta Raggi Maria, *Rapid HPLC analysis of the antiepileptic lamotrigine and its metabolites in human plasma*, dostupné z <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=19070903>
- [31] Elizabeth Greiner-Sosanko, Darla R. Lower, Mohamed A. Virji, and Matthew D. Krasowski, *Simultaneous determination of lamotrigine, zonisamide, and carbamazepine in human plasma by high-performance liquid chromatography*, dostupné z <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2231333>
- [32] K. M. Matara, P. J. Nicholls, S. A. Bawazira, M. I. Al-Hassana and A. Teklea, *A rapid liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in plasma*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, July 1998
- [33] Pavlíková Lucie. *Diplomová práce: Stanovení lamotriginu spolu s ostatními antiepileptiky*, Pardubice, 2003
- [34] European Pharmacopoeia, Supplement 6.3. C.H. Beck, Nördlingen, 2008
- [35] European Pharmacopoeia 6 (Ph. Eur. 6). C.H. Beck, Nördlingen, 2007

SOUHRN

HPLC metoda pro hodnocení lamotriginu a jeho příbuzných látek v tabletách

Rigorózní práce

Mgr. Blanka Foltinská

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Byla optimalizována metoda pro stanovení čistoty a stability lamotriginu. Lamotrigin byl vystaven takovým podmínkám, aby došlo k jeho rozložení na rozkladné produkty a tedy i možné nečistoty lamotriginu. Bylo použito více chromatografických kolon a optimalizovalo se složení mobilní fáze. Byla vybrána chromatografická kolona Waters Spherisorb 5 μm Phenyl, 4,6 x 250mm a mobilní fáze o složení acetonitril, pufr hydrogenfosforečnanu didraselného (1,4 g/l) v poměru 35:65; pH mobilní fáze se nastaví kyselinou fosforečnou na hodnotu 6,0. Průtoková rychlost byla 1,0 ml/min, nástřik 20 μl , teplota na koloně 25 $^{\circ}\text{C}$, UV detekce při 309 nm. Tato metoda byla vypracována tak, aby se dala použít při stanovení obsahu lamotriginu a příbuzných látek v tabletách s obsahem lamotriginu. Byly prozkoušeny validační parametry této metody.

ABSTRACT

HPLC method for determination of lamotrigine and related substances in tablets

Rigorous thesis

Mgr. Blanka Foltinská

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

The method for determination of purity and stability of lamotrigine was optimized. Lamotrigine was exposed to such conditions to reach its degradation into degradation products which are also possible impurities of lamotrigine. Several chromatography columns were tested and the composition of mobile phase was optimized. Chromatography column Waters Spherisorb 5 μm Phenyl, 4,6 x 250mm was chosen and mobile phase containing acetonitril : phosphate buffer (1,4 g K_2HPO_4 /l) 35:65, final pH of the mobile phase was adjusted to 6.0 by orthophosphoric acid. Flow rate was 1 ml/min, injected volume 20 μl , column temperature 25°C and UV detection at 309 nm. Linearity of this method was tested under these conditions. This method was worked up to enable its using in determination of content of lamotrigine and related substances in tablets containing lamotrigine. Validation parameters of this method were tested.