

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Romana Lijić

**SIMULTANO ODREĐIVANJE ANTIEPILEPTIKA U BIOLOŠKIM UZORCIMA HPLC
METODOM**

Diplomski rad

Akadska godina: 2016./2017.

Mentor:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Su-mentor:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

U Splitu, listopad 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Romana Lijić

**SIMULTANO ODREĐIVANJE ANTIEPILEPTIKA U BIOLOŠKIM UZORCIMA HPLC
METODOM**

Diplomski rad

Akadska godina: 2016./2017.

Mentor:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Su-mentor:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

U Splitu, listopad 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Farmaceutska toksikologija
Tema rada je prihvaćena na sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. Davorka Sutlović i dr. sc. Maja Veršić Bratinčević
Pomoć pri izradi:

SIMULTANO ODREĐIVANJE ANTIEPILEPTIKA U BIOLOŠKIM UZORCIMA HPLC METODOM

Romana Lijić, broj indeksa: 69

Sažetak:

Ciljevi istraživanja: Razviti metodu za simultano određivanje karbamazepina, lamotrigina i fenobarbitona koristeći visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju, odrediti optimalne uvjete metode za određivanje antiepileptika visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom, te ispitati valjanost razvijene metode na biološkim uzorcima krvi.

Ustroj istraživanja: eksperimentalna studija

Mjesto istraživanja: Kemijsko-toksikološki laboratorij Kliničkog odjela za sudsku medicinu, Zavoda za patologiju, citologiju i sudsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra u Splitu

Materijali i metode: Pripremljene su otopine lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina te odgovarajuća mobilna faza, miješanjem pufera, metanola i acetonitrila u različitim omjerima. Ispitivani su parametri za odabir optimalne metode za simultano određivanje sva tri antiepileptika koristeći HPLC metodu, uključujući promjenu valne duljine (306 nm, 270 nm i 220 nm), temperature (30 °C i 40 °C) i protoka mobilne faze (0,5-1,4 mL/min). Izuzeti biološki uzorci krvi, s dodatkom otopina lijekova, ekstrahirani su metodom tekuće-tekuće (LLE), te su injektirani u HPLC uređaj.

Rezultati: HPLC analizom je uspješno dokazano prisustvo lamotrigina na sve tri ispitivane valne duljine, s najizraženijim odzivom na valnoj duljini od 270 nm, dok je prisustvo fenobarbitona dokazano samo pri mjerenju na valnoj duljini 270 nm. Iz tog razloga valna duljina od 270 nm odabrana je za daljnje ispitivanje karbamazepina, čije je prisustvo pod tim uvjetima uspješno dokazano. Prilagodbom protoka mobilne faze uspješno je skraćeno mrtvo vrijeme analize. Primjenom razvijene metode na realne biološke uzorke krvi simultano su određena sva tri ispitivana antiepileptika.

Zaključak: Analizom provedenom visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom uspješno je simultano dokazano prisustvo tri antiepileptika: lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina. Razvijena optimalna metoda i parametri za kvalitativnu i kvantitativnu analizu tri antiepileptika uspješno je primijenjena na realne biološke uzorke. Od velike je važnosti razviti metode za određivanje koncentracije antiepileptika ponajviše zbog prilagodavanja terapija pacijenata. Za daljnje istraživanje preporučuje se analizirati veći broj antiepileptika za određivanje što učinkovitije i brže metode primjenjive u svakodnevnom laboratorijskom radu.

Glavne riječi: antiepileptici, biološki uzorci, ekstrakcija tekuće-tekuće, HPLC metoda

Rad sadrži: 56 stranica, 22 slike, 3 tablice, 45 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

- | | | |
|----|--|---------------------------|
| 1. | Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić | predsjednica Povjerenstva |
| 2. | doc. dr. sc. Ivana Mudnić | član |
| 3. | prof. dr. sc. Davorka Sutlović | član-mentor |

Datum obrane: (24.10.2017.)

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Rudera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia**

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Pharmaceutical toxicology
Thesis subject was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, and Faculty Council of School of Medicine.
Mentor: Davorka Sutlović, PhD, full prof.
Technical assistance: Maja Veršić Bratinčević, PhD

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ANTIEPILEPTICS IN BIOLOGICAL SAMPLES USING HPLC METHOD

Romana Lijić, index number: 69

Summary:

Objectives: Development of a method for the simultaneous determination of carbamazepine, lamotrigine and phenobarbital by using highly effective liquid chromatography, to determine the optimal conditions for the determination of antiepileptics by high performance liquid chromatography and to investigate the efficacy of the chromatographic method on biological samples of blood.

Design: Experimental study

Settings: Laboratory of toxicology, Department of pathology, medicine and cytology, University Hospital of Split

Materials and methods: Lamotrigine, phenobarbital and carbamazepine solutions were prepared and the appropriate mobile phase was mixed, by mixing the buffer, methanol and acetonitrile in various ratios. The parameters for selecting the optimal method for simultaneous determination of all three antiepileptics using the HPLC method were investigated, including a change of wavelength (306 nm, 270 nm and 220 nm), temperature (30 °C and 40 °C) and mobile phase flow (0.5 - 1.4 mL / min). Biological blood samples, supplemented with drug solutions, were extracted by liquid-liquid (LLE) method and injected into an HPLC device.

Results: HPLC analysis has successfully demonstrated the presence of lamotrigine on all three wavelengths investigated, with the most pronounced response at wavelength of 270 nm, while the presence of phenobarbital is only proved when measuring at wavelength 270 nm. For that reason, the wavelength of 270 nm was selected for further testing of carbamazepine, whose presence under these conditions has been successfully proved. Adapting the mobile phase flow shortened the dead time of the analysis. By applying the developed method to real biological blood samples simultaneously, all three antiepileptics tested were determined.

Conclusion: High performance liquid chromatography was successfully used for simultaneous determination of three antiepileptics: lamotrigine, phenobarbital and carbamazepine. An optimal method and parameters for qualitative and quantitative analysis of three antiepileptics were determined separately and in biological samples. It is of great importance to develop methods for determining the concentration of antiepileptics mainly due to adaptation of patient therapy. For further research it is recommended to use a greater number of antiepileptics to determine the most efficient and quickest method applicable to daily laboratory work.

Key words: antiepileptics, biological samples, liquid-liquid extraction, HPLC method

Thesis contains: 56 pages, 22 figures, 3 tables, 45 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Vedrana Čikeš Čulić – PhD, associate prof. | Chair person |
| 2. Ivana Mudnić – PhD, associate prof. | Member |
| 3. Davorka Sutlović - PhD- full prof. | Supervisor |

Defence date: (24.10. 2017.)

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Rudera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Antiepileptici	4
1.1.1 Mehanizam djelovanja antiepileptika	7
1.1.2. Simultano određivanje antiepileptika	8
1.2. Biološki uzorci.....	8
1.2.1 Krv	9
1.3. Priprema uzoraka za analizu.....	10
1.4. Instrumentalna analiza (kromatografska analiza).....	10
1.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	11
2. CILJEVI	15
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Kemikalije	18
3.2. Priprema otopina antiepileptika.....	18
3.2.1 Priprema otopine fenobarbitona.....	18
3.2.2. Priprema otopine karbamazepina.....	20
3.2.3. Priprema otopine lamotrigina.....	21
3.3. Priprema mobilne faze za instrumentalnu analizu.....	22
3.4. Priprema uzoraka za kromatografsku analizu	22
3.5. Instrumenti.....	23
3.5.1. Radni uvjeti HPLC kromatografske metode.....	24
4. REZULTATI	25
4.1. Kvalitativno određivanje lamotrigina koristeći visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju	26
4.2. Kvalitativno određivanje lamotrigina i fenobarbitona koristeći visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju.....	27
4.3. Kvalitativno određivanje lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina koristeći visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju	28
4.3.1. Usporedba odziva lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina pri različitim koncentracijama	29
4.4. Ispitivanje protoka mobilne faze	30
4.5. Optimalni uvjeti metode za izradu umjernih krivulja.....	31
4.6. Primjenjivost HPLC metode na kliničke biološke uzorke.....	32

5. RASPRAVA.....	33
6. ZAKLJUČCI	36
8. SAŽETAK.....	42
9. SUMMARY.....	45
10. ŽIVOTOPIS.....	48

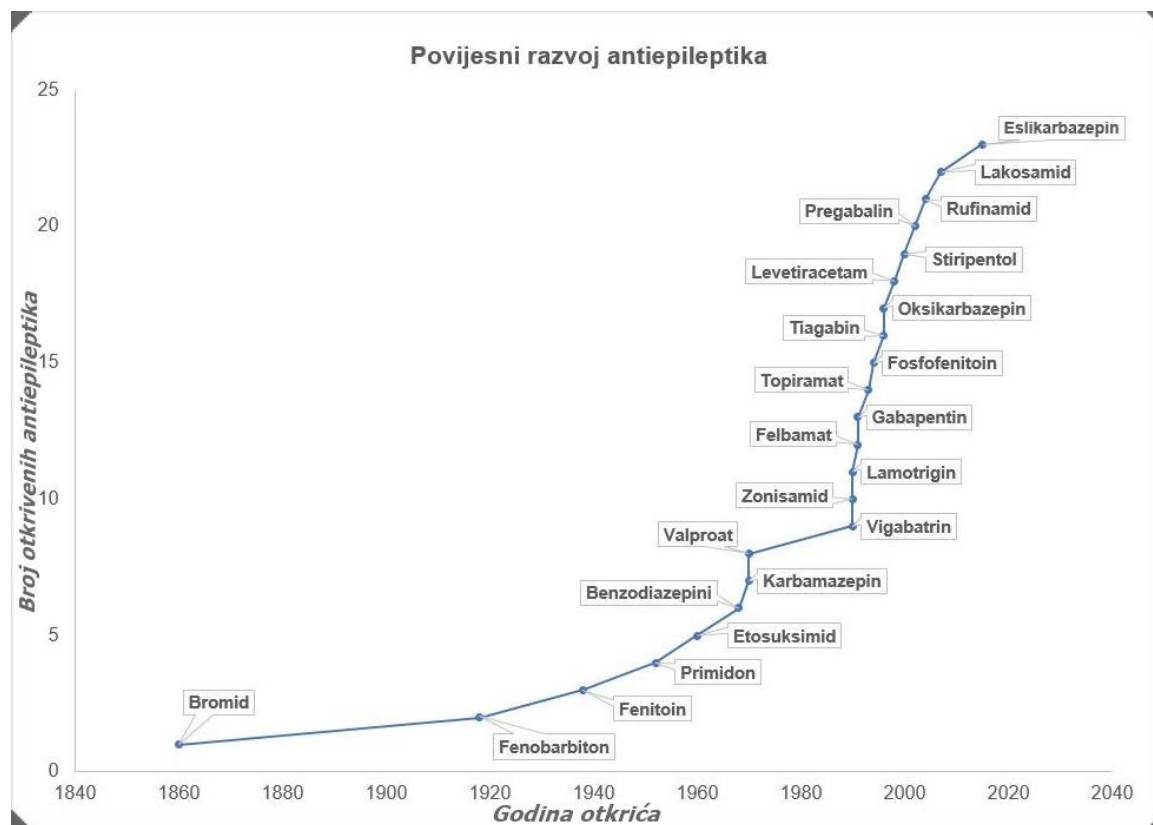
Zahvaljujem se prof. dr. sc. Davorki Sutlović na stručnom vođenju i savjetima pri izradi i pisanju ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojoj su-mentorici dr. sc. Maji Veršić Bratinčević na velikodušnoj pomoći i strpljenju tijekom izrade diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji, mojim prijateljima i mom dečku Josipu na neizmjerljivoj podršci i ljubavi tijekom svih ovih godina.

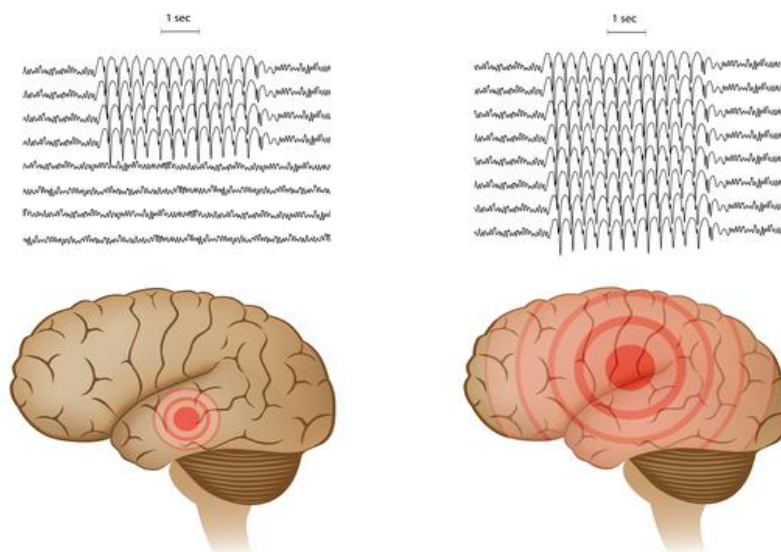
1. UVOD

Istraživanja u području farmakologije i toksikologije nepotpuna su bez saznanja o lijekovima i događajima koji su doveli do njihovih uvođenja. Prve ljekovite tvari dobivene su iz prirodnih izvora te su predstavljale bilje, korijenje i gljivice. Do sredine devetnaestog stoljeća lijekovi iz prirode bili su dostupni čovjeku kao jedino za ublažavanje boli i patnje. Prvi sintetički lijek, kloral hidrat, otkriven je 1869. godine te se koristio kao sedativ (hipnotik). Prvi analgetici i antipiretici, poput fenacetina i acetanilida, bili su jednostavni derivati anilina i p-nitrofenola koji su nusproizvodi katrana drvenog ugljena. Kemijskom modifikacijom stoljećima poznate salicilne kiseline nastao je i prvi "blockbuster" farmaceutske industrije- Aspirin®. Početkom dvadesetog stoljeća prvi od barbiturata našao je svoje mjesto u farmakopeji, a ostalo je, kako kažu, povijest.[1] 1938. godine otkriven je fenitoin, a nakon njega sintetizirani su primidon, karbamazepin i valproatna kiselina. Ubrzo nakon njihove sinteze uočeno je da i benzodiazepini imaju antikonvulzivnu aktivnost te je ovim otkrićem zaokružena prva generacija antiepileptika (Slika 1).[2]



Slika 1. Povijesni razvoj antiepileptika.[3]

Epilepsija je kronični neurološki poremećaj kojega karakteriziraju učestali, ponavljajući napadaji. Od nje boluje 1% svjetske populacije te je drugi najčešći neurološki poremećaj iza moždanog udara. Napadaji su rezultat abnormalnog električnog pražnjenja moždanih neurona, a ono je najčešće posljedica raznih infekcija, neuroloških poremećaja, ozljeda glave, no mogu biti i genetski uvjetovani.[4] Epileptični napadaji dijele se na generalizirane i parcijalne. Kod generaliziranih napadaja, električna izbijanja nastaju difuzno te zahvaćaju čitavu moždanu koru obje hemisfere od početka napadaja, a svijest je obično poremećena. Parcijalni napadaji najčešće nastaju radi strukturalnih abnormalnosti (Slika 2).[5] Dvije trećine pacijenata s aktivnom epilepsijom drže svoju bolest pod kontrolom zahvaljujući antiepileptičkim lijekovima.[7]



Slika 2. Prikaz parcijalnog i generaliziranog epileptičnog napadaja.[6]

1.1 Antiepileptici

Antiepileptici (antikonvulzivi) su lijekovi koji se koriste za kontroliranje ili sprječavanje napadaja (konvulzija).[8] U novije se vrijeme koriste za liječenje bipolarnog poremećaja, poremećaja ličnosti te kao stabilizatori raspoloženja.[9] Za razliku od ostalih lijekova, antiepileptici se ne svrstavaju u kategorije prema načinu djelovanja jer im djelovanje još uvijek nije do kraja razjašnjeno, i jer većina antiepileptika ima više od jednog učinka na organizam.[10] Antiepileptici se mogu podijeliti u dvije osnovne skupine, odnosno generacije, s obzirom na vrijeme proizvodnje i početka konzumacije. U skupinu „starih“ antiepileptika ubrajaju se: fenobarbiton, fenitoin, acetazolamid, primidon, etosuksimid, sultiam, karbamazepin, valproati, klonazepam, klobazam i piracetam. Posljednjih 20-ak godina odobreno je više novih lijekova za liječenje epilepsije nego u bilo kojem drugom neurološkom području. U „novu“ generaciju antiepileptika ubrajaju se: vigabatrin, lamotrigin, gabapentin, felbamat, topiramet, tiagabin, fosfenitoin, oksikarbazepin, levetiracetam, pregabalin, zonisamid, rufinamid, stiripentol, lakozamid i eslikarbazepin acetat (Slika 3).[11]



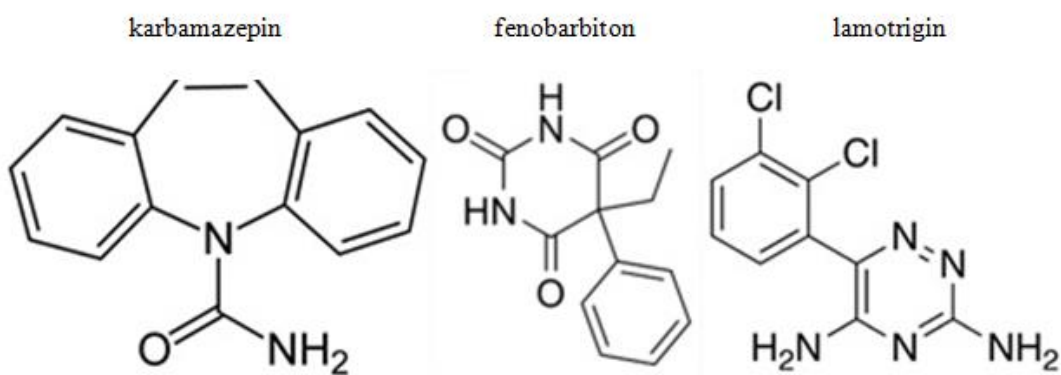
Slika 3. Podjela antiepileptika.[12]

Cilj liječenja epilepsije je dobra kontrola napadaja sa što manjom dozom lijeka koja ima što manje nuspojava. Monoterapija ima prednost nad politerapijom. Smatra se da je bolje davati jedan lijek u većoj dozi, nego dva ili više lijekova u manjoj dozi zbog nepredvidljivih nuspojava i interakcija lijekova, a i zbog praktičnosti u primjeni. Ukoliko se jedan antiepileptik pokaže neučinkovitim ne smije se naglo prekinuti uzimanje, nego se postepeno smanjuje doza s paralelnom primjenom novog antiepileptika čija se doza postepeno povećava. U 2/3 bolesnika moguće je monoterapijom dovesti bolest pod kontrolu, ali u 1/3 je potrebna politerapija.[17] U politerapiji i monoterapiji često se koriste karbamazepin, lamotrigin i fenobarbiton (Slika 4).

Karbamazepin je triciklički spoj koji je izvorno bio razvijen za terapiju trigeminalne neuralgije. Po strukturi je sličan fenitoinu. Vezan je za proteine plazme, ali nisu uočene interakcije s drugim lijekovima zbog istiskivanja s istih. Inducira mikrosomske enzime i potrebna je, barem u početku liječenja, stalna prilagodba doze. Metabolizira se u jetri, a najvažniji metabolit je karbamazepin-10,11-epoksid, koji ima znatan antikonvulzivni učinak. Kao alternativa parenteralnoj primjeni karbamazepina kod statusa epilepticusa ispituje se i rektalna primjena lijeka, koja se pokazala sigurna i učinkovita kao dugodjelujuća terapija. Ima mehanizam djelovanja sličan fenitoinu, ali je učinkovitiji u terapiji parcijalnih napadaja. Koristi se i u liječenju neuropatske boli i bipolarnog poremećaja. Nuspojave ovise o dozi, pa se tako mogu pojaviti dvoslike, ataksija, poremećaji motorike, gastrointestinalne smetnje, hiponatrijemija, aplastična anemija, agranulocitoza, kožni eritemi i hepatotoksičnost.[17]

Lamotrigin je otkriven 1994. godine. Ima široki spektar djelovanja te su njegove indikacije: parcijalne i generalizirane epilepsije, simptomatske ili idiopatske, te epileptičke encefalopatije. Može se koristiti u monoterapiji ili u politerapiji pri čemu je posebno učinkovit u kombinaciji s valproatom. Lamotrigin je dobro podnošljiv, no vrlo je važna pravilna titracija lijeka. Posebno je važno vrlo polagano uvoditi lamotrigin sa valproatom jer valproat povećava koncentraciju lamotrigina u plazmi. Također, ako lamotrigin dodajemo u već postojeću terapiju sa karbamazepinom, mogu se javiti simptomi neurotoksičnosti karbamazepina.[31]

Fenobarbiton je jedan od najstarijih antikonvulzivnih lijekova sa sedirajućim djelovanjem zbog čega se ne primjenjuje više tako često. Derivat je barbituratne kiseline. Apsorpcija fenobarbitona je dobra i 50% lijeka se veže za plazmatske proteine. Sporo se eliminira iz plazme s poluvremenom od 50 – 140 sati. Oko 25% se izlučuje nepromijenjeno urinom, dok se ostatak metabolizira oksidacijom i konjugacijom u jetri putem mikrosomalnih enzima. Snažan je induktor CYP enzima i snižava plazmatsku koncentraciju drugih lijekova koji su paralelno u primjeni. Najčešći neželjeni učinak koji se javlja pri terapijskim koncentracijama je sedacija. Ostale nuspojave su megaloblastična anemija i osteomalacija. Predoziranje dovodi do nastupa kome i zakazivanja respiracije i cirkulacije, a hemodijaliza se pokazala učinkovitom u snižavanju plazmatskih koncentracija fenobarbitona.[17]

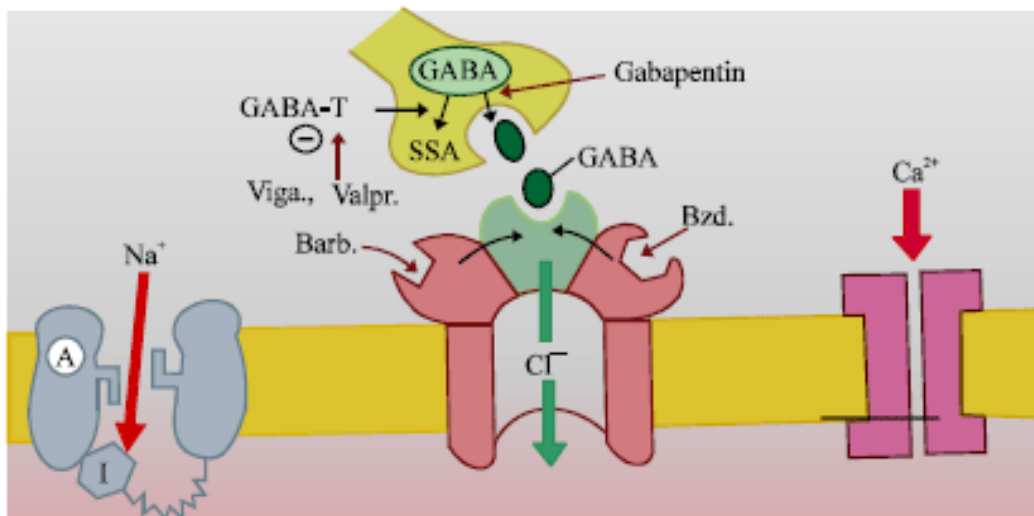


Slika 4. Strukturne formule karbamazepina, fenobarbitona i lamotrigina.[32,33,34]

1.1.1 Mehanizam djelovanja antiepileptika

Antiepileptički lijekovi za cilj imaju suzbijanje abnormalnih električnih izbijanja, pri čemu ne djeluju na uzrok napadaja, nego je njihova uloga simptomatsko liječenje. Tri glavna mehanizma djelovanja nameću se kao najvažniji za sve lijekove iz ove skupine: povećanje GABA aktivnosti, inhibicija funkcije natrijevih kanala i inhibicija funkcije kalcijevih kanala (Slika 5).[13]

1. Gama-aminomaslačna kiselina je glavni inhibitorni neuroprijenosnik u središnjem živčanom sustavu sisavaca. Ona igra glavnu ulogu u smanjenju neuronske podražljivosti kroz živčani sustav. Kod ljudi, GABA je također izravno odgovorna za regulaciju mišićnog tonusa.[14,15] GABA se veže za dvije vrste receptora: GABA_A (ionski kanali) i GABA_B (metabotropni receptori).[16] Neki antiepileptici ireverzibilno inhibiraju enzim GABA-transaminazu koji je odgovoran za inaktivaciju GABA-e (vigabatrin), dok drugi djeluju tako da inhibiraju ponovnu pohranu GABA-e povećavajući koncentraciju tog spoja (tiagabin). Fenobarbiturati i benzodiazepini djeluju na GABA_A receptore tako što povećavaju otvaranje kloridnih kanala.[17]
2. Na⁺ kanali iniciraju akcijske potencijale u neuronima i ostalim podražljivim stanicama i odgovorni su za širenje akcijskih potencijala duž živaca.[18] Antiepileptički lijekovi poput fenitoina, karbamazepina i lamotrigina inhibiraju natrijeve kanale te smanjuju staničnu ekscitabilnost smanjenjem ulaska natrija u neurone.[19]
3. Ca²⁺ kanali su membranski proteini koji sadrže selektivne pore za kalcij koje se otvaraju depolarizacijom membranskog napona.[20] Etosuksimid blokira kalcijске kanale a sličnu aktivnost ima i valproat. Neki dokazi upućuju da čak i fenitoin može imati ulogu u inhibiranju kalcijevih kanala.[21]



Slika 5. Mjesta djelovanja antiepileptika.[22]

1.1.2. Simultano određivanje antiepileptika

Antiepileptici se koriste za liječenje epilepsije u mono ili politerapiji. Jedan od najvažnijih ciljeva kod praćenja plazmatskih koncentracija antiepileptika jest simultano određivanje koncentracija onih koji se najčešće koriste u obliku politerapije. Tradicionalne analitičke metode za određivanje antiepileptika u plazmi ili serumu koriste tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) ili rjeđe, imunokemijske metode. Postoji jako malo HPLC metoda za simultano određivanje antiepileptika npr. za određivanje lamotrigina s karbamazepinom i fenobarbitonom. Vrlo je važno pažljivo pratiti pacijente koji koriste ove lijekove kako bi se smanjile nuspojave ili toksični učinci.[23]

1.2. Biološki uzorci

Biološki uzorci su uzorci ljudi ili životinja izuzeti iz živog bića ili postmortem. U forenzičkoj toksikologiji se koriste različiti uzorci poput mokraće, krvi i želučanog sadržaja. U određenim okolnostima kao uzorak mogu poslužiti i druge tjelesne tekućine i tkiva poput slin,

kose i noktiju.[24] Kod živih osoba uzorak je potrebno izuzeti prije konzumacije terapijske doze lijeka, pohraniti ga u spremnik s jasno napisanim imenom i prezimenom pacijenta, vrstom uzorka, vremenom uzimanja te s potpisom osobe koja je uzorak izuzela. Do dostave uzorka na analizu treba voditi računa da se uzorci pohrane u hladnjak na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, ukoliko će se uzorak pripremiti i analizirati 2-3 dana nakon izuzimanja, u protivnom se pohranjuje na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. [24]

1.2.1 Krv

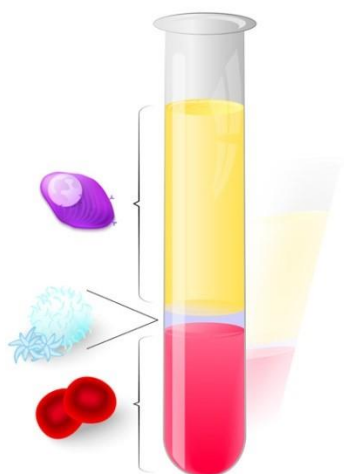
Krv je tekućina koja cirkulira srčano krvožilnim sustavom te sačinjava oko 8% tjelesne mase čovjeka. Sastoji se od tekućeg dijela, plazme, i krvnih stanica, eritrocita, leukocita i trombocita (Slika 6). Od velikog je značaja za detekciju, a osobito za kvantitativno određivanje i interpretaciju koncentracije lijekova i droga.[24] Laboratoriji obično izvode terapijsko praćenje antiepileptika na uzorcima seruma ili plazme.[25] Vrlo je korisno odrediti koncentraciju antiepileptika u plazmi, naročito u slučaju primjene više lijekova, jer se time može podešavati doza radi uspješnije terapije.[26]

SASTAV KRVI

Plazma (55%)

Bijele krvne stanice
i trombociti (cca. 4%)

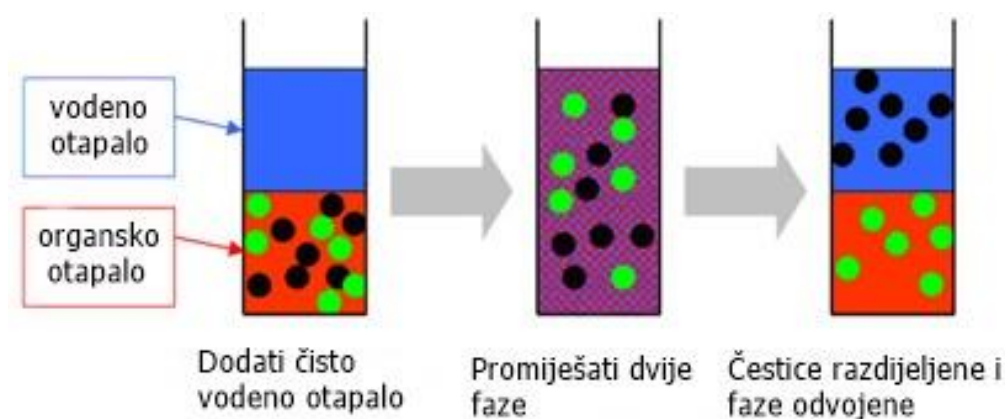
Crvene
krvne stanice (45%)



Slika 6. Sastav biološkog uzorka krvi.[35]

1.3. Priprema uzoraka za analizu

Prije kromatografske analize odgovarajućom analitičkom metodom iz biološkog uzorka (plazma, mokraćna, želučani sadržaj, kosa, tkiva...) potrebno je izolirati spojeve od interesa. Biološki materijali su kompleksni, a koncentracije otrovnih spojeva i ksenobiotika su često vrlo niske. Endogene komponente u biološkom materijalu (proteini, lipidi i slično) mogu interferirati s analitom te ih je potrebno ukloniti prije analize, a analit ukoncentrirati, da bi ih se lakše detektiralo nekom od metoda izbora.[24] Uzorak je važno pravilno izuzeti i pohraniti, a za analitičku pripremu što kvalitetnijeg uzorka koriste se brojne pred-analitičke metode.[27] Za pripremu bioloških uzoraka najčešće se koristi ekstrakcija na čvrstim nosačima (*engl.* Solid phase extraction, **SPE**) i ekstrakcija tekuće- tekuće (*engl.* liquid- liquid extraction, **LLE**). Ekstrakcija na čvrstim nosačima koristi se za odjeljivanje organskih spojeva (lijekovi, opojne droge, pesticidi) iz biološkog materijala korištenjem njihovih različitih afiniteta za nosače u kolonama. Ekstrakcija tekuće- tekuće je postupak kojim se otopljena tvar raspoređuje između dviju tekućina koje se ne miješaju (Slika 7), te je prikladna za hitne analize uzoraka s nepoznatim analitima, kada je potrebno izolirati spojeve s različitim fizikalno- kemijskim svojstvima.[24]



Slika 7. Shematski prikaz ekstrakcije tekuće- tekuće.[28]

1.4. Instrumentalna analiza (kromatografska analiza)

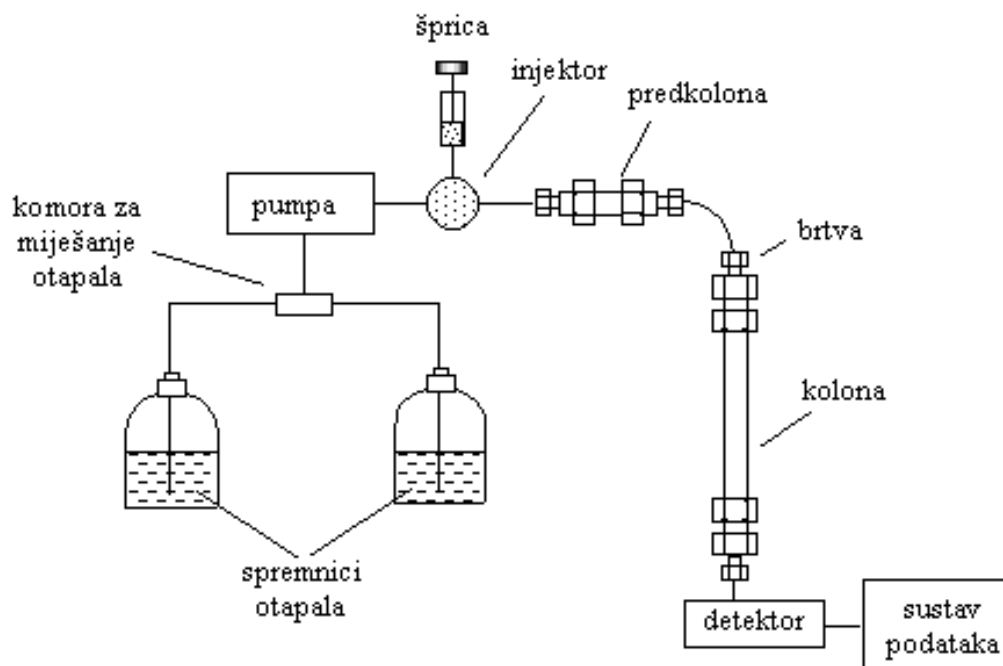
Kromatografija je jedna od vodećih analitičkih metoda i omogućava razdvajanje i kvantitativno određivanje tvari veoma slične strukture i kemijskih osobina.[36] Sve

kromatografske tehnike odlikuje posjedovanje stacionarne faze (nepokretne) kroz koju dolazi do razdvajanja i izoliranja dijelova smjese otopljene u mobilnoj (pokretnoj) fazi.

Kromatografija može biti analitička i pripremna. Pripremna kromatografija bavi se razdvajanjem komponenti iz smjese radi dalje obrade, te se može smatrati metodom pročišćavanja, dok analitička kromatografija podrazumijeva mjerenje relativnog omjera komponenti u smjesi.[37]

1.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl.* High performance liquid chromatography, HPLC) je analitička tehnika koja se koristi za odjeljivanje, prepoznavanje i kvantificiranje svake komponente u smjesi.[38] Iako je prisutna od 1969. godine njena upotreba se povećala tek kada je postala komercijalno dostupna. Sadašnju popularnost zahvaljuje dobroj separaciji različitih vrsta uzoraka, iznimnoj razdjelnoj snazi, brzini i vrlo niskom pragu detekcije koji se kreće u nanomolima.[24] Princip rada HPLC-a je forsiranje prolaska analizirane tvari ili smjese kroz stupac (cijev punjenu materijalom sačinjenim od sitnih čestica, a time i velike površine) pumpanjem tekućine (mobilne faze) pod visokim tlakom kroz sam stupac. Postupak predviđa unošenje malog volumena uzorka u tok mobilne faze i na temelju specifičnih kemijskih i fizičkih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenata smjese.[39] Visok tlak otapala omogućuje uporabu kolona s mnogo manjim promjerom čestica stacionarne faze (3-5 μm), te se time značajno poboljšava razdjeljivanje komponenata uzorka i skraćuje vrijeme analize (Slika 8).[24]

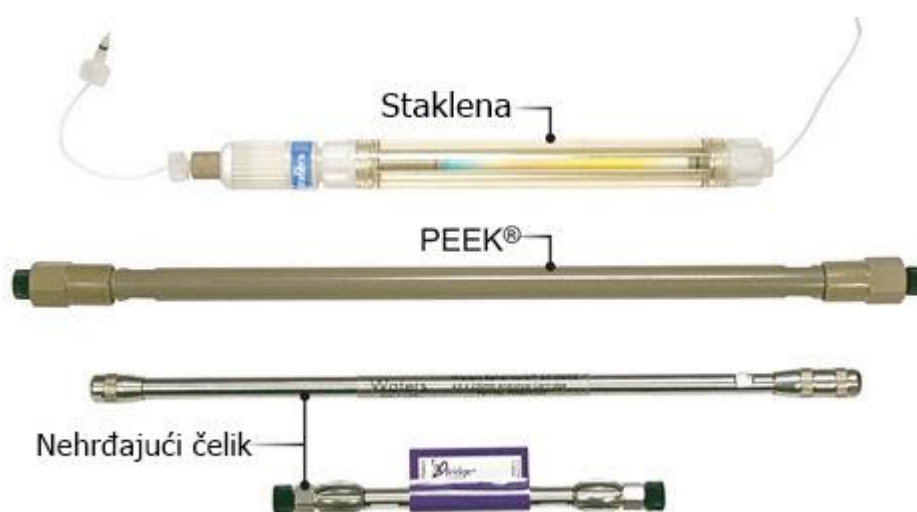


Slika 8. Shematski prikaz HPLC sustava.[29]

Pumpe moraju osiguravati stalan protok, odnosno ponovljive volumene eluiranja i površine pikova neovisno o promjenama viskoznosti i začepljenosti kolone. Moderne pumpe moraju osigurati: raspon protoka od 0.01 do 10 mL/min, stabilnost protoka (< 1%) i maksimalni tlak od 34 500 kPa.[24]

Injektor mora osigurati reproducibilno injektiranje tekućeg uzorka različitih volumena (0,1-100 mL) pri visokom tlaku, maksimalno smanjiti oscilacije protoka mobilne faze i osigurati što uže pikove. Za injektiranje se mogu koristiti igle, ali se mnogo češće koriste ventili. Ventilnim injektorima omogućuje se brzo i reproducibilno injektiranje različitih volumena uzorka. Okretanjem ventila u smjeru sata dio petlje napunjen uzorkom postavlja se u struju mobilne faze koja ga unosi na početak kolone.[24]

Kolone mogu biti čelične ili staklene, obložene čelikom ili polietar eter ketonom. Obično su 10-25 cm dugačke, unutarnjeg promjera 4,0-4,6 mm i napunjene stacionarnom fazom s vrlo sitnim česticama (3-10 μm). Uz pravilnu uporabu i održavanje HPLC kolone mogu trajati vrlo dugo. Pri izboru kolone potrebno je obratiti pažnju na sastav i veličinu čestica stacionarne faze te na dimenzije kolone. Najčešće se koriste stacionarne faze na bazi siloksana koji je trodimenzionalno umrežen, te njegove modifikacije dobivene vezanjem ugljikovodika (Slika 9).[24]



Slika 9. Tri vrste kolona za HPLC.[30]

Detektori za HPLC važni su za detekciju analita koji izlaze iz kolone nakon eluiranja, prikazujući električni signal proporcionalan intenzitetu tvari koja se eluira ili mobilnoj fazi. Postoje UV-VIS detektor, maseni spektrometar, fluorescentni detektor, elektrokemijski detektor i detektor indeksa loma. Danas se u HPLC sustavima najviše koriste optički detektori. Optički detektori propuštaju zraku svjetlosti koja na putu do ćelije (*engl.* flow-cells) prolazi kroz efluent koji izlazi iz kolone. Promjena u intenzitetu svjetlosti zrake koja prolazi kroz efluent registrira se kao promjena izlaznog napona. Promjena napona snima se i šalje u integrator ili računalo koji nam daju podatke o retencijskom vremenu i površini pika. Ovisno o vrsti optičkog detektora, može se pratiti promjena intenziteta zrake zbog UV-apsorpcije, fluorescentne emisije ili

promjene refrakcijskog indeksa. U analizi lijekova i droga najčešće se koriste UV/VIS detektori koji mjere apsorpciju UV ili vidljivih zraka na spojevima otopljenima u efluentu. Čelije su obično dugačke 5-10 mm i volumena 5-10 μL . Takvi detektori su dovoljno osjetljivi za mnoge spojeve, ne smetaju im male fluktuacije protoka i temperature i ne uništavaju uzorak, tako da se uzorak može skupljati i dalje ispitivati nekim drugim detektorom.[24]

2. CILJEVI

Ciljevi ovog rada bili su:

1. Odrediti prisustvo antiepileptika, karbamazepina, lamotrigina i fenobarbitona visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom.
2. Ispitati optimalne uvjete i razviti metodu za simultano određivanje karbamazepina, lamotrigina i fenobarbitona koristeći visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju.
3. Ispitati djelotvornost kromatografske metode na biološkim uzorcima krvi s dodatkom otopina sva tri ispitivana antiepileptika, karbamazepina, lamotrigina i fenobarbitona.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

U ovom istraživanju korištene su sljedeće kemikalije:

Metanol, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Acetonitril, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

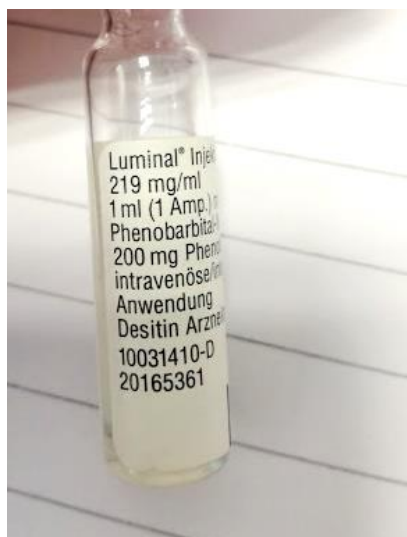
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

3.2. Priprema otopina antiepileptika

3.2.1 Priprema otopine fenobarbitona

Otopina fenobarbitona pripremljena je razrjeđivanjem sadržaja ampule Luminal® s vodom (Slika 10).



Slika 10. Ampula Luminal®

Umjerna krivulja dobivena je razrjeđivanjem sadržaja ampule Luminal® masene koncentracije 219 000 mg/L ($\gamma_1=219000$ mg/L). Razrjeđivanjem početne otopine s vodom pripremljene su vrijednosti masenih koncentracija: $\gamma_2=21900$ mg/L, $\gamma_3=2190$ mg/L, $\gamma_4=219$ mg/L, $\gamma_5=100$ mg/L, $\gamma_6=30$ mg/L, $\gamma_7=20$ mg/L, $\gamma_8=10$ mg/L, prikazano u tablici 1. Instrumentalnom analizom ispitivane su koncentracije izdvojene u prikazanoj tablici ($\gamma_5=100$ mg/L i $\gamma_7=20$ mg/L)

Tablica 1. Priprema otopine fenobarbitona

	Masene koncentracije dobivenih otopina (mg/L)	Volumen otopine (μ L)	Volumen vode (μ L)	Ukupni volumen otopine (mL)
γ_1	219000			
γ_2	21900	100 γ_1	900	1
γ_3	2190	100 γ_2	900	1
γ_4	219	100 γ_3	900	1
γ_5	100	457 γ_4	543	1
γ_6	30	300 γ_5	700	1
γ_7	20	200 γ_5	800	1
γ_8	10	100 γ_5	900	1

3.2.2. Priprema otopine karbamazepina

Otopina karbamazepina dobivena je otapanjem tablete Tegretol® u 10 mL metanola. Umjerna krivulja karbamazepina dobivena je razrjeđivanjem početne otopine Tegretol® koncentracije 20000 mg/L ($\gamma_1=20000$ mg/L). Razrjeđivanjem početne otopine s metanolom pripremljene su vrijednosti koncentracija $\gamma_2=2000$ mg/L, $\gamma_3=200$ mg/L, $\gamma_4=100$ mg/L, $\gamma_5=50$ mg/L, $\gamma_6=5$ mg/L, $\gamma_7=2.5$ mg/L, $\gamma_8=1$ mg/L što je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Priprema otopine karbamazepina

	Masene koncentracije dobivenih otopina (mg/L)	Volumen otopine (μ L)	Volumen metanola (μ L)	Ukupni volumen otopine (mL)
γ_1	20000			
γ_2	2000	900 γ_1	100	1
γ_3	200	900 γ_2	100	1
γ_4	100	500 γ_3	500	1
γ_5	50	500 γ_4	500	1
γ_6	5	100 γ_5	900	1
γ_7	2.5	50 γ_5	950	1
γ_8	1	20 γ_5	980	1



Slika 12. Tablete Tegretol®

3.2.3. Priprema otopine lamotrigina

Otopina lamotrigina pripravljena je otapanjem jedne tablete Lamictal™ u 10 mL vode. Umjerna krivulja dobivena je razrjeđivanjem početne otopine Lamictal™ koncentracije 10000 mg/L ($\gamma_1=10000$ mg/L). Razrjeđivanjem početne smjese s vodom dobivene su otopine koncentracija $\gamma_2=1000$ mg/L, $\gamma_3=100$ mg/L, $\gamma_4=50$ mg/L, $\gamma_5=10$ mg/L, $\gamma_6=5$ mg/L, $\gamma_7=1$ mg/L, prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Priprema otopine lamotrigina

	Masene koncentracije dobivenih otopina (mg/L)	Volumen otopine (μ L)	Volumen vode (μ L)	Ukupni volumen otopine (μ L)
γ_1	10000			
γ_2	1000	100 γ_1	900	1
γ_3	100	100 γ_2	900	1
γ_4	50	500 γ_3	500	1
γ_5	10	200 γ_4	800	1
γ_6	5	100 γ_4	900	1
γ_7	1	20 γ_4	980	1



Slika 13. Tablete Lamictal™

3.3. Priprema mobilne faze za instrumentalnu analizu

Pufer je pripremljen miješanjem dviju otopina- A i B. Otopina A pripremljena je vaganjem 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i otapanjem u 250 mL destilirane vode, a otopina B otapanjem 1,77 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u destiliranoj vodi do konačnog volumena 250 mL. Nakon miješanja otopine A i B, pH vrijednost se podesi 6,9, te se filtrira kroz filter veličine pora 0,45 μm (Milipore). Mobilna faza pripremljena je miješanjem 450 mL pripremljenog pufera s 175 mL acetonitrila i 125 mL metanola, te se tako dobivena mobilna faza još jednom profiltrira.

3.4. Priprema uzoraka za kromatografsku analizu

Dvama dobrovoljcima, dokazano negativnih na prisustvo sva tri ispitivana lijeka, izvađena krv je pohranjena u epruvetu za biokemijske analize. Uzorci krvi su centrifugirani 15 minuta na 2600 rpm-a, serum je izdvojen i pohranjen na + 4 °C do analize.

Ekstrakcija

Izdvojeno je 1 mL seruma u epruvetu za ekstrakciju. Uzorak je zalužen koristeći 100 μ L 1M NaOH te doda 5 mL smjese etil acetata i n-heksana (1:1). Smjesa se snažno vorteksira 10 sekundi, nakon čega se ekstrahira 30 min na rotoru za ekstrakciju na 50 rpm-a, te se potom ponovno centrifugira 15 min na 2600 rpm. Odvoji se 4 mL gornjeg sloja u epruvetu za evaporaciju, koja se postavi na evaporator spojen s dovodom dušika, te se evaporira u struji dušika dok otapalo potpuno ne ispari. Dobiveni talog se otopi koristeći 150 μ L destilirane vode te se tako pripremljen uzorak injektira u HPLC uređaj.

3.5. Instrumenti

U istraživanju su korišteni sljedeći instrumenti:

- HPLC Shimadzu, tip: LC- 20A series (Slika 14)
- Centrifuga centric, Tehnica
- Digitalna tehnička vaga; Kern: mjerenje na 3 decimalne
- Rotor za ekstrakciju, Vorteks; IKA



Slika 14. HPLC Shimadzu[40]

3.5.1. Radni uvjeti HPLC kromatografske metode

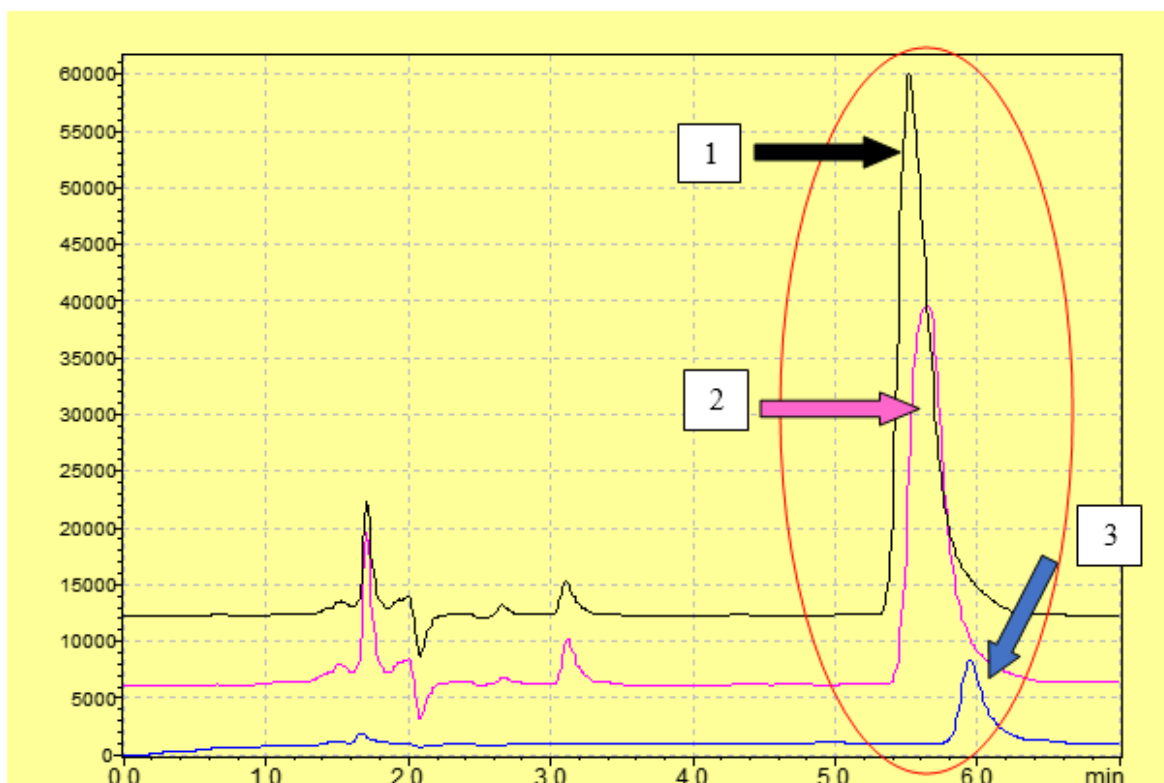
Ispitivani uvjeti:

- Valna duljina: 306 nm; 270 nm; 220 nm
- Temperatura : 30 °C; 40 °C
- Protok: 1,4 mL/min; 1,2 mL/min; 1 mL/min; 0,8 mL/min; 0,5 mL/min

4. REZULTATI

4.1. Kvalitativno određivanje lamotrigina koristeći visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju

Za određivanje prisustva lamotrigina i usporedbu visine odziva na kromatogramu ispitivane su tri valne duljine- 306, 270 i 220 nm, koristeći isti protok i temperaturu, u cilju određivanja optimalne valne duljine i odziva na kromatogramu. Kao što je prikazano na Slici 15, prisustvo lamotrigina dokazano je ispitivanjem koristeći sve tri valne duljine.

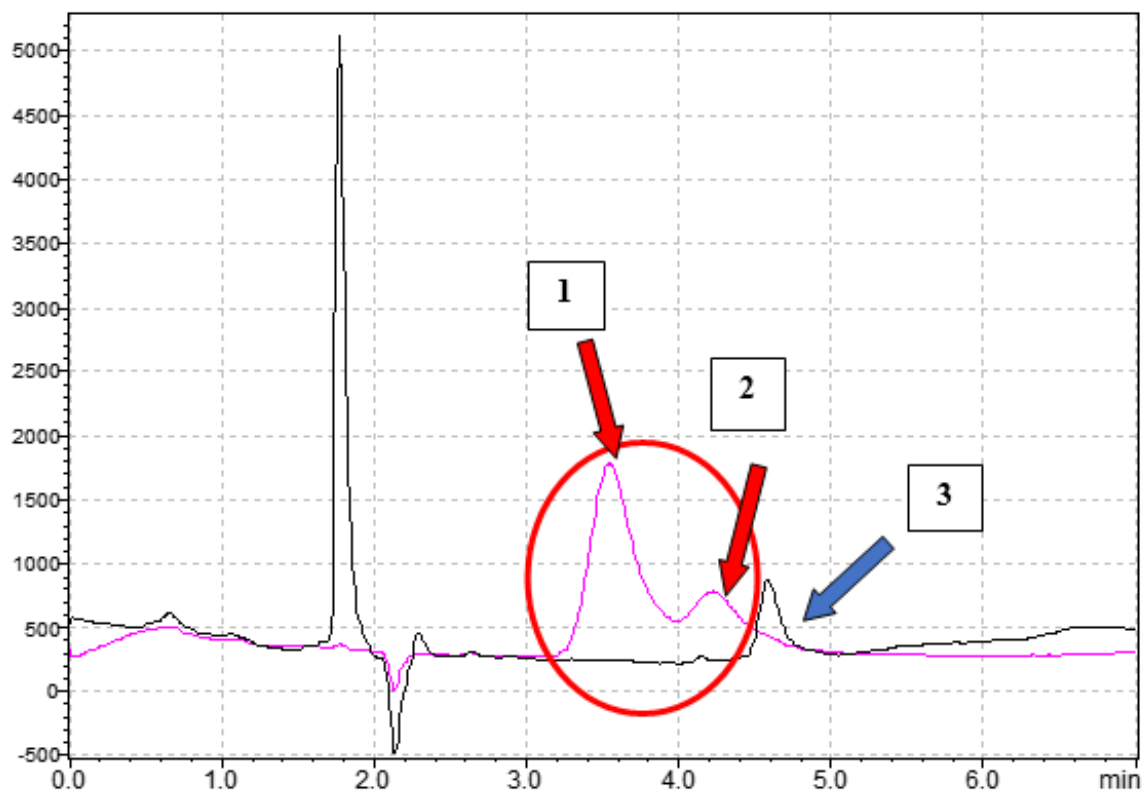


Slika 15. Uvećani prikaz usporedbe tri odziva (označenih brojevima 1-3) dobivenih analizom lamotrigina na 3 valne duljine, pri protoku mobilne faze od 1,4 mL/min i temperaturi od 30 °C.

- 1- Uvećani prikaz odziva lamotrigina ispitivanog na valnoj duljini- 270 nm
- 2- Uvećani prikaz odziva lamotrigina ispitivanog na valnoj duljini- 220 nm
- 3- Uvećani prikaz odziva lamotrigina ispitivanog na valnoj duljini- 306 nm

4.2. Kvalitativno određivanje lamotrigina i fenobarbitona koristeći visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju

Za određivanje prisustva fenobarbitona ispitivane su tri valne duljine- 306, 270 i 220 nm, koristeći isti protok i temperaturu u cilju određivanja optimalne valne duljine i odziva na kromatogramu. Valna duljina od 306 nm nije dala pozitivan rezultat, odnosno, izostao je odziv fenobarbitona. Na valnoj duljini od 220 nm dolazi do preklapanja odziva lamotrigina i fenobarbitona, dok su pri valnoj duljini od 270 nm odzivi razdvojeni i lako uočljivi (Slika 16).

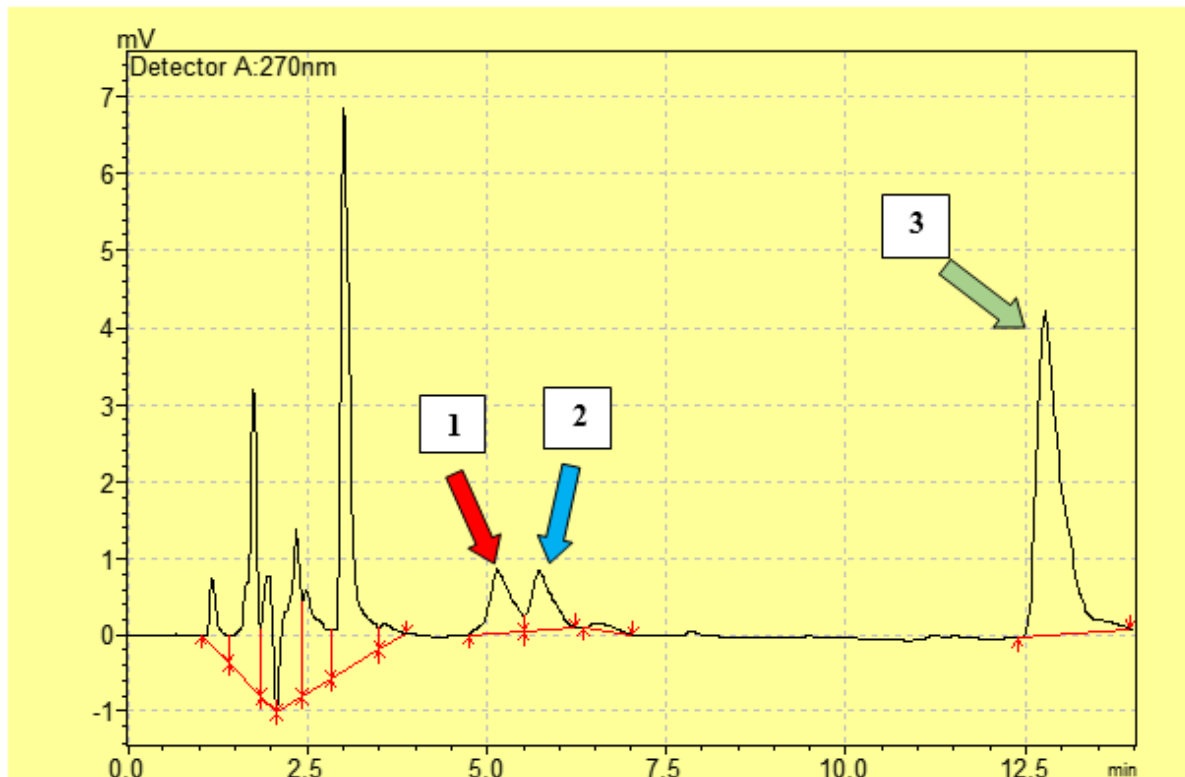


Slika 16. Uvećani prikaz usporedbe odziva (označenih brojevima 1-3) dobivenih analizom lamotrigina i fenobarbitona pri mjerenju dvije valne duljine, 220 i 270 nm, pri protoku mobilne faze od 0,8 mL/min i temperaturi od 40 °C.

- 1- Uvećani prikaz odziva fenobarbitona ispitivanog na valnoj duljini od- 270 nm
- 2- Uvećani prikaz odziva lamotrigina ispitivanog na valnoj duljini od- 270 nm
- 3- Uvećani prikaz odziva lamotrigina i fenobarbitona ispitivanih na valnoj duljini od- 220 nm

4.3. Kvalitativno određivanje lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina koristeći visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju

Ispitivanjem i odabirom najoptimalnije valne duljine (270 nm) u HPLC uređaj su injektirana sva tri antiepileptika, te su njihovi odzivi uspješno očitavani pri istoj temperaturi i protoku mobilne faze, kao što je prikazano na Slici 17.

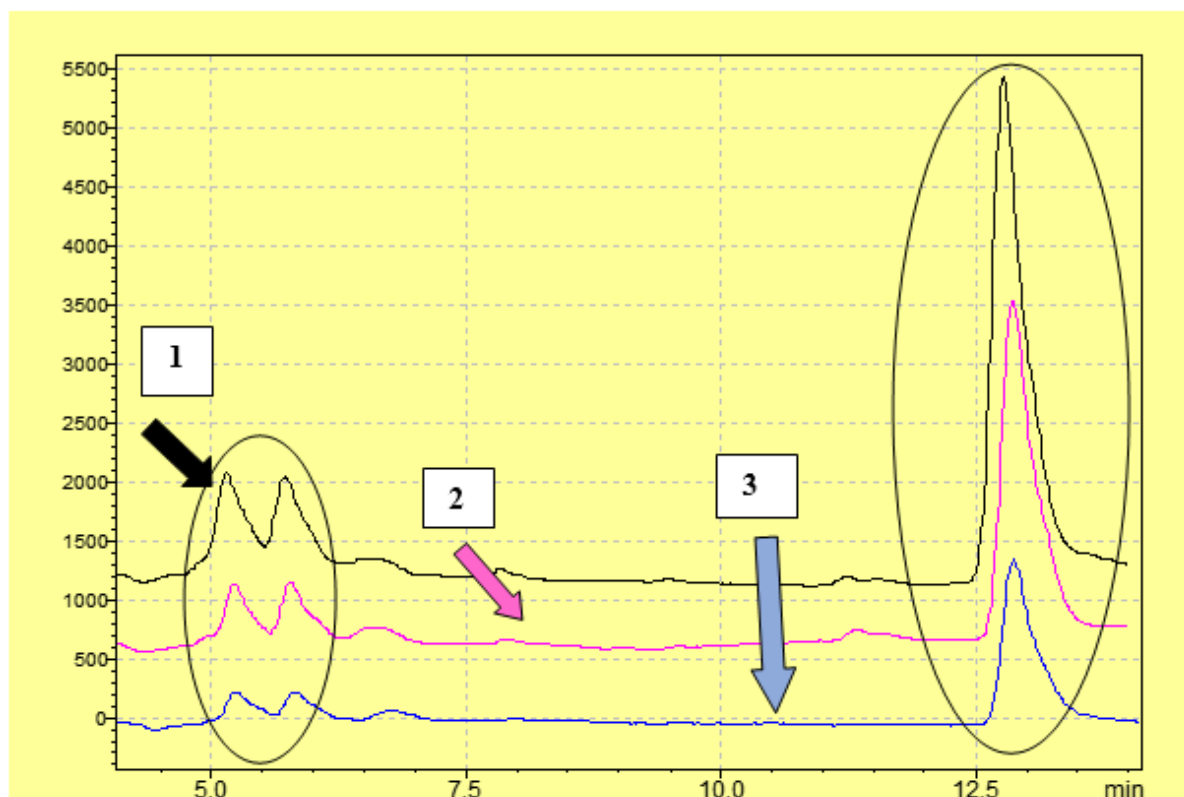


Slika 17. Uvećani prikaz odziva (označenih brojevima 1-3) dobivenih analizom fenobarbitona, lamotrigina i karbamazepina na valnoj duljini od 270 nm, pri protoku mobilne faze od 1,4 mL/min-0,8 mL/min-1,4 mL/min i temperaturi od 40 °C

- 1- Uvećani prikaz odziva fenobarbitona ispitivanog na valnoj duljini od- 270 nm
- 2- Uvećani prikaz odziva lamotrigina ispitivanog na valnoj duljini od- 270 nm
- 3- Uvećani prikaz odziva karbamazepina ispitivanog na valnoj duljini od- 270 nm

4.3.1. Usporedba odziva lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina pri različitim koncentracijama

Nakon detekcije sva tri antiepileptika, u uređaj je injektiran lamotrigin u koncentracijama od 2,5 mg/L, 5 mg/L i 7,5 mg/L, fenobarbiton u koncentracijama od 10 mg/L, 20 mg/L i 30 mg/L i karbamazepin u koncentracijama od 2,5 mg/L, 5 mg/L i 7,5 mg/L te su uspoređivani odzivi koristeći isti protok mobilne faze i temperaturu, kao što je prikazano na Slici 18.



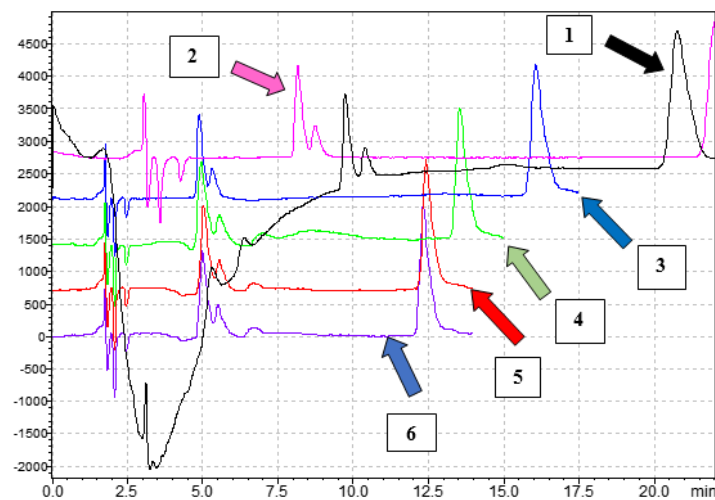
Slika 18. Usporedba uvećanih prikaza odziva (označenih brojevima 1-3) dobivenih analizom različitih koncentracija lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina na valnoj duljini od 270 nm, protoku mobilne faze od 1,4 mL/min-0,8 mL/min-1,4 mL/min i temperaturi od 40 °C

- 1- Uvećani prikaz odziva najveće koncentracije fenobarbitona, lamotrigina i karbamazepina ispitivanih na valnoj duljini od- 270nm
- 2- Uvećani prikaz odziva srednje koncentracije fenobarbitona, lamotrigina i karbamazepina ispitivanih na valnoj duljini od- 270nm

- 3- Uvećani prikaz odziva najmanje koncentracije fenobarbitona, lamotrigina i karbamazepina ispitivanih na valnoj duljini od- 270 nm

4.4. Ispitivanje protoka mobilne faze

Ispitivani su različiti protoci mobilne faze za određivanje najoptimalnije vrijednosti za simultano dokazivanje sva tri ispitivana antiepileptika, lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina (Slika 19).

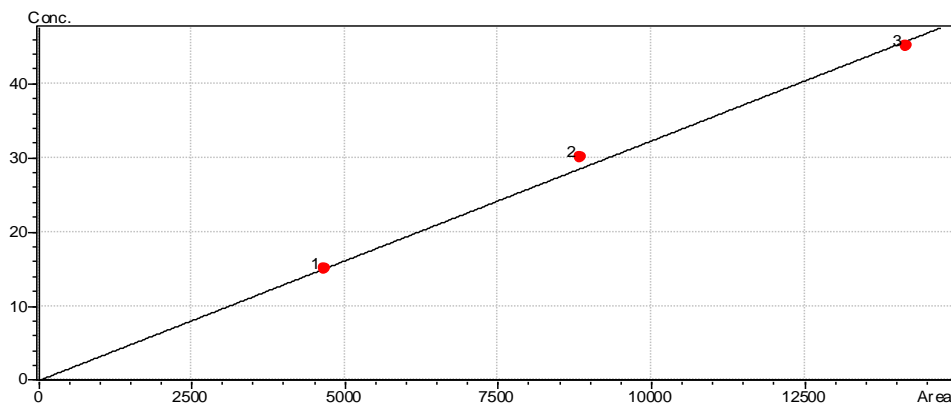


Slika 19. Usporedba uvećanih odziva lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina pri različitim protocima mobilne faze:

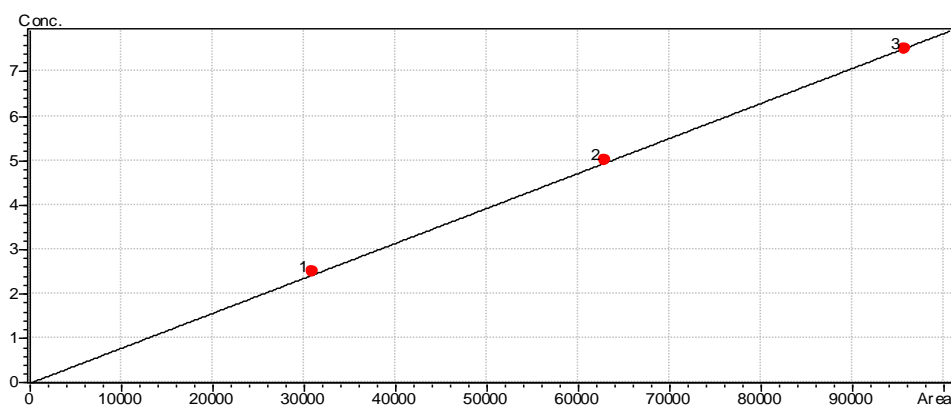
- 1- Uvećani prikaz odziva sva tri antiepileptika pri protoku mobilne faze od 0,7 mL/min
- 2- Uvećani prikaz odziva sva tri antiepileptika pri protoku mobilne faze od 0,8 mL/min
- 3- Uvećani prikaz odziva sva tri antiepileptika pri protoku mobilne faze od 0,8 mL/min i 1,4 mL/min
- 4- Uvećani prikaz odziva sva tri antiepileptika pri protoku mobilne faze od 0,7- 1,4 mL/min
- 5- Uvećani prikaz odziva sva tri antiepileptika pri protoku mobilne faze od 0,8-1,4-1,6 mL/min
- 6- Uvećani prikaz odziva sva tri antiepileptika pri protoku mobilne faze od 0,8-1,4-2 mL/min

4.5. Optimalni uvjeti metode za izradu umjernih krivulja

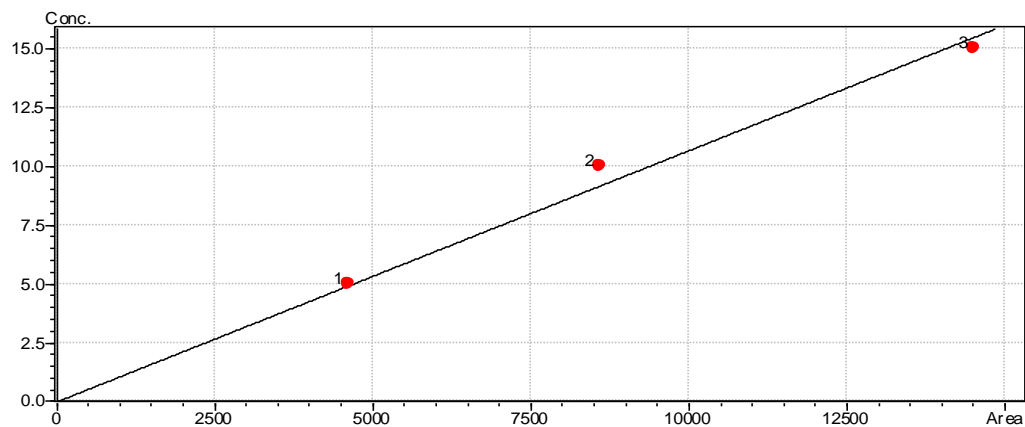
Umjerne krivulje fenobarbitona, karbamazepina i lamotrigina, dobivene analizom pripremljenih i injektiranih otopina HPLC tehnikom, prikazane su na slikama (20, 21, i 22). Linearnost krivulje fenobarbitona mjerena je između 10 i 40 mg/L, karbamazepina između 2,5 i 7,5 mg/L, a lamotrigina između 5 i 15 mg/L, što odgovara koncentracijama unutar njihovih terapijskih doza. Optimalni uvjeti rada HPLC uređaja pri kojima su izrađene umjerne krivulje su: valna duljina 270 nm, temperatura 40 °C i protok mobilne faze 1,4 mL/min (od 0-3,8 min); 0,8 mL/min (od 3,8-6,3 min); 1,6mL/min (od 6,3-12,40 min).



Slika 20. Grafički prikaz umjerne krivulje fenobarbitona (10-40 mg/L)



Slika 21. Grafički prikaz umjerne krivulje karbamazepina (2,5-7,5 mg/L)



Slika 22: Grafički prikaz umjerne krivulje karbamazepina (5-15 mg/L)

4.6. Primjenjivost HPLC metode na kliničke biološke uzorke

Analizom dvaju negativnih bioloških uzoraka na prisustvo lamotrigina fenobarbitona i karbamazepina, sakupljenih od dobrovoljaca, u koje je dodan volumen od 100 μ L svakog od navedenih antiepileptika, korištenjem prethodno razvijene metode, dobiveni su odzivi na kromatogramu usporedivi s odzivima prikazanim na Slici 17 u poglavlju 4.3. Odzivi su očekivano manji od odziva čistog standarda zbog brojnih endogenih komponenti koje se nalaze u samom biološkom uzorku, te interferiraju s njima.

5. RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je razviti metodu za simultano dokazivanje tri antiepileptika (lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina) u biološkim uzorcima. Antiepileptici koji se koriste za tretman epileptičkih napadaja danas su među najčešćim lijekovima za koje klinički laboratoriji provode TDM (*engl.* Therapeutic Drug Monitoring).[41] Analiza uzoraka koji se injektiraju u HPLC uređaj zahtijeva određene pred analitičke korake. Za uspješno dokazivanje antiepileptika pripremljene su tri otopine otapanjem svakog pojedinog antiepileptika u odgovarajućem otapalu.[42] Mobilna faza pripremljena je po uzoru na mobilnu fazu koju su u svom istraživanju koristili Khoschsorur i suradnici.[23] Mobilna faza ima važnu ulogu u transportu smjese kroz kolonu. Uzorci moraju biti u potpunosti topivi u mobilnoj fazi kako bi im se odzivi prikazali na kromatogramu.[43] Shihabi je u svom istraživanju zaključio da je pH mobilne faze vrlo važan za razdjeljivanje lijeka od endogenih supstanci koje se nalaze u serumu, pogotovo kod određivanja lijekova koji se jako vežu za proteine plazme poput karbamazepina ili fenobarbitona.[44]

Nakon pripreme otopina antiepileptika i mobilne faze važno je ispitati uvjete pri kojima se analiziraju uzorci, a podrazumijevaju izbor odgovarajućeg tlaka, temperature i protoka mobilne faze. Testirane su početne vrijednosti temperature, valne duljine i protoka mobilne faze (navedene u poglavlju 3.6.1.), a prvi lijek koji je pripremljen, injektiran, analiziran te kvalitativno dokazan pri navedenim uvjetima je lamotrigin. Na Slici 15, u poglavlju 4.1., prikazani su odzivi lamotrigina na sve tri ispitivane valne duljine pri temperaturi od 30 °C. Najbolji odziv lamotrigina dobiven je pri ispitivanoj valnoj duljini od 270 nm. Nakon dokazanog prisustva lamotrigina, pripremljen je te u uređaj injektiran drugi lijek- fenobarbiton. Iz rezultata, prikazanih na Slici 16 u poglavlju 4.2., vidljivo je da je fenobarbiton uspješno dokazan samo na valnoj duljini 270 nm, koja je iz tog razloga odabrana za daljnje ispitivanje. Valna duljina od 306 nm odbačena je radi izostanka odziva fenobarbitona, a valna duljina od 220 nm zbog preklapanja odziva lamotrigina i fenobarbitona. Moguća greška, zbog koje je došlo do preklapanja, je odabir više temperature (40° C) pri kojoj se provodila simultana analiza lamotrigina i fenobarbitona. Matar i suradnici u svom su istraživanju uspješno dokazali prisustvo lamotrigina i fenobarbitona na 220 nm, no istraživanje je provedeno na temperaturi od 25 °C.[45] Nakon dokazivanja prisustva lamotrigina i fenobarbitona, pripremljen je i u HPLC uređaj injektiran karbamazepin. Prilagođavanjem uvjeta, protoka, temperature i valne duljine, uspješno su simultano određena sva tri ispitivana lijeka (Slika 17, poglavlje 4.3.), te su određeni najoptimalniji uvjeti rada HPLC

uređaja. Za provjeru osjetljivosti metode, dodatno su ispitane još dvije koncentracije sva tri antiepileptika. Ispitivane koncentracije lamotrigina i karbamazepina bile su 2,5 mg/L i 7,5 mg/L, dok je fenobarbiton ispitivan pri koncentracijama od 10 mg/L i 30 mg/L. Dobiveni rezultati potvrdili su uspješno provedenu kvalitativnu i kvantitativnu analizu (Slika 18, poglavlje 4.3.1.).

Obzirom da je svaku metodu preporučljivo ispitati na realnim uzorcima, razvijena metoda primijenjena je na biološke uzorke krvi, negativne na prisustvo ispitivanih antiepileptika. Metoda izbora pripreme uzoraka je ekstrakcija tekuće-tekuće jer je ona opće prihvaćena tehnika za pripremu uzoraka namijenjenih za ispitivanje spojeva s različitim fizikalno-kemijskim svojstvima.[24] U biološke uzorke dodana je poznata koncentracija svakog ispitivanog antiepileptika te su pripremljeni uzorci injektirani u HPLC uređaj.

Dosadašnja istraživanja pokazuju slične rezultate. Khoschorur, Frühwirth i Halwachs-Baumann razvili su metodu za određivanje 9 različitih antiepileptika. Istraživanje su vršili na temperaturi od 50 °C i na valnoj duljini od 205 nm. Postigli su vrlo uočljive i precizne odzive svih devet lijekova na kromatogramu za samo 23 minute, te razvili vrlo efikasnu i brzu metodu za simultano određivanje antiepileptika, što se pokazalo jako korisnim i primjenjivim za pacijente na politerapiji kao i za rad u laboratoriju, obzirom da takve simultane metode omogućuju uštedu kemikalija kao i vremena pripreme i analize uzoraka na odabranoj instrumentalnoj tehnici.[23]

U ovom istraživanju, korištenjem prethodno razvijene metode i ispitanih optimalnih uvjeta uspješno su simultano dokazana sva tri antiepileptika u biološkim uzorcima, a odzivi su usporedivi s odzivima analiziranih otopina lijekova (Slika 17, poglavlje 4.3.), čime je uspješno potvrđena klinička primjenjivost razvijene metode.

6. ZAKLJUČCI

1. Analizom provedenom visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom uspješno je simultano dokazano prisustvo tri antiepileptika: lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina.
2. Određena je optimalna metoda i parametri za kvalitativnu i kvantitativnu analizu tri antiepileptika.
3. Razvijena HPLC metoda primjenjiva je za kvalitativnu i kvantitativnu analizu lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina u biološkim uzorcima krvi
4. Od velike je važnosti razviti metode za određivanje koncentracije antiepileptika za bolje razumijevanje korisnosti i učinkovitosti samih lijekova, ponajviše zbog prilagođavanja terapija pacijenata.
5. Za daljnje istraživanje preporučuje se koristiti veći broj antiepileptika i veći izbor bioloških uzoraka kako bi se odredila što efikasnija i brža metoda primjenjiva u svakodnevnom laboratorijskom radu.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Jones AW. Early drug discovery and the rise of pharmaceutical chemistry. *Drug Test Anal.* 2011 Jun;3(6):337-44.
2. Brodie MJ. Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure- European Journal for Epilepsy.* 2010 Dec;19(10): 650–655
3. URL: <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1059131111000136-gr1.jpg> (pristup 23.04.2017.)
4. Katzung B. *Basic and Clinical Pharmacology.* 12th Edition. Mcgraw Hill, New York, 2012
5. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/epilepsija-konvulzije> (pristup 23.04.2017.)
6. URL: <https://ghr.nlm.nih.gov/art/large/brain-activity-partial-generalized-seizures.jpeg> (pristup 23.04.2017.)
7. URL: <https://www.nice.org.uk/guidance/CG137/chapter/Introduction> (pristup 25.04.2017.)
8. URL: <http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=20523> (pristup 25.04.2017.)
9. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Anticonvulsant> (pristup 25.04.2017.)
10. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1167.2005.463007.x/pdf> (pristup 26.04.2017.)
11. URL: http://neurologiacroatica.com/hr/pdf/1-2_neuro_2010-3.pdf (pristup 27.04.2017.)
12. URL: <https://image.slidesharecdn.com/newerantiepilepticdrugs-160531135151/95/newer-antiepileptic-drugs-5-638.jpg?cb=1464702745> (pristup 27.04.2017)
13. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *PHARMACOLOGY,* International edition, 7th edition, Churchill Livingstone, London, 2012
14. Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol.* 2002;213:1-47.
15. Li K, Xu E. The role and the mechanism of gamma-aminobutyric acid during central nervous system development. *Neurosci Bull.* 2008 Jun;24(3):195-200.

16. French-Constant RH, Rocheleau TA, Steichen JC, Chalmers AE. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature*. 1993 Jun 3;363(6428):449-51.
17. URL: http://perpetuum-lab.com.hr/wiki/plab_wiki/farmakologi/antiepileptici-r273/ (pristup 28.04.2017.)
18. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98195/#mantegazza.r1> (pristup 28.04.2017.)
19. URL: <http://www.pharmacorama.com/en/Sections/Sodium-7.php> (pristup 28.04.2017.)
20. Bean, Bruce P, and McDonough, Stefan I (Sep 2010) Calcium Channels. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
21. URL: <http://www.openaccessjournals.com/articles/mechanisms-of-action-of-antiepileptic-drugs.pdf> (pristup 28.04.2017.)
22. URL: <http://docsdrive.com/images/knowledgia/ajbs/2011/fig1-2k11-201-220.gif> (pristup 28.04.2017.)
23. Khoschorur, G.A., Frühwirth, F. & Halwachs-Baumann, G. *Chromatographia* (2001) 54:345.
24. Sutlović D i sur. *Osnove Forenzične toksikologije*. Split: Redak; 2011.
25. URL: <https://www.labmedic.org/bs/strucni-radovi/551-antiepileptici-laboratorijsko-praenje-terapije> (pristup 28.04.2017.)
26. URL: <http://medicinski.lzmk.hr/antiepileptici/> (pristup 28.04.2017.)
27. URL: https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf (pristup 28.04.2017)
28. URL: <http://faculty.ksu.edu.sa/18856/Extraction/Liquid-Liquid%20Extraction%20Principle.jpg> (pristup 28.04.2017)
29. URL: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/sl097.gif (pristup 28.04.2017.)
30. URL: http://www.waters.com/webassets/cms/category/media/other_images/primer_M-1_Columnexamples.jpg (pristup 28.04.2017.)
31. URL: <https://www.zdravobudi.hr/clanak/313/epilepsija> (pristup 29.04.2017.)
32. URL: <http://lh3.googleusercontent.com/Kh0sDqDjfw4/TnH9rhEf6yI/AAAAAAAAASA/3IvUQJCz-5Y/carbamazepine-structure.png> (pristup 29.04.2017.)

33. URL:
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/87/Phenobarbital.png/120px-Phenobarbital.png> (pristup 29.04.2017.)
34. URL: <http://pharmaffiliates.com/struactor/PA%2012%2004000.png> (pristup 29.04.2017.)
35. URL: <http://drmartinko.com/hr/upotreba-prf-a-u-stomatologiji/> (pristup 29.04.2017.)
36. Savić, J., Savić, M.: Osnovi analitičke hemije, Svjetlost Sarajevo, 1987.
37. URL: <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=34154> (pristup 29.04.2017.)
38. Gerber, F.; Krummen, M.; Potgeter, H.; Roth, A.; Siffrin, C.; Spöndlin, C. "Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3µm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice". *Journal of Chromatography A*. 2004 ;1036 (2): 127-133
39. Settle, F.A.: Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry, Prentice Hall, 1997, ISBN 0-13-177338-0
40. URL:
<http://www.barascientific.com/products/shimadzu/analytical/chromato/eng/HPLC/LC-20A.php> (pristup 27.5.2017)
41. URL: <https://www.labmedic.org/bs/strucni-radovi/551-antiepileptici-laboratorijsko-praenje-terapije> (pristup 28.5.2017)
42. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2554> (pristup 28.5.2017)
43. URL: <http://lab-training.com/2014/06/20/desirable-properties-hplc-mobile-phase/> (pristup 28.5.2017)
44. Z.K. Shihabi: Review of Drug Analysis with Direct Serum Injection on the HPLC Column, *Journal of Liquid Chromatography* 2006 Dec; 11(8)
45. Kamal M. Matar, Paul J. Nicholls, Asgedom Tekle, Saleh A. Bawazir, Mohammed I. Al-Hassan, Liquid Chromatographic Determination of Six Antiepileptics Drugs and Two Metabolites in Microsamples of Human Plasma, *Therapeutic Drug Monitoring*, 1999; 21:559-566

8. SAŽETAK

NASLOV RADA:

Simultano određivanje antiepileptika u biološkim uzorcima HPLC metodom.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

Razviti metodu za simultano određivanje karbamazepina, lamotrigina i fenobarbitona koristeći visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju, odrediti optimalne uvjete metode za određivanje antiepileptika visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom, te ispitati djelotvornost kromatografske metode na biološkim uzorcima krvi.

USTROJ ISTRAŽIVANJA:

Eksperimentalna studija

MJESTO ISTRAŽIVANJA:

Kemijsko-toksikološki laboratorij Kliničkog odjela za sudsku medicinu Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra u Splitu.

MATERIJALI I METODE:

Pripremljene su otopine lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina te odgovarajuća mobilna faza, miješanjem pufera, metanola i acetonitrila u različitim omjerima. Ispitivani su parametri za odabir optimalne metode za simultano određivanje sva tri antiepileptika koristeći HPLC metodu, uključujući promjenu valne duljine (306 nm, 270 nm i 220 nm), temperature (30 °C i 40 °C) i protoka mobilne faze (0,5- 1,4 mL/min). Izuzeti biološki uzorci krvi, s dodatkom otopina lijekova, ekstrahirani su metodom tekuće-tekuće (LLE), te su injektirani u HPLC uređaj.

REZULTATI:

HPLC analizom je uspješno dokazano prisustvo lamotrigina na sve tri ispitivane valne duljine, s najizraženijim odzivom na valnoj duljini od 270 nm, dok je prisustvo fenobarbitona dokazano samo pri mjerenju na valnoj duljini 270 nm. Iz tog razloga valna duljina od 270 nm odabrana je za daljnje ispitivanje karbamazepina, čije je prisustvo pod tim uvjetima uspješno dokazano. Prilagodбом protoka mobilne faze uspješno je skraćeno mrtvo vrijeme analize. Primjenom razvijene metode na realne biološke uzorke krvi simultano su određena sva tri ispitivana antiepileptika.

ZAKLJUČAK:

Analizom provedenom visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom uspješno je simultano dokazano prisustvo tri antiepileptika: lamotrigina, fenobarbitona i karbamazepina. Određena je optimalna metoda i parametri za kvalitativnu i kvantitativnu analizu tri antiepileptika zasebno i u biološkim uzorcima. Od velike je važnosti razviti metode za određivanje koncentracije antiepileptika ponajviše zbog prilagođavanja terapija pacijenata. Za daljnje istraživanje preporučuje se koristiti veći broj antiepileptika kako bi se odredila što efikasnija i brža metoda primjenjiva u svakodnevnom laboratorijskom radu.

9. SUMMARY

DIPLOMA THESIS TITLE:

Simultaneous determination of antiepileptics in biological samples using HPLC method

OBJECTIVES:

Develop a method for the simultaneous determination of carbamazepine, lamotrigine and phenobarbital by using highly effective liquid chromatography, to determine the optimal conditions for the determination of antiepileptics by high performance liquid chromatography and to investigate the efficacy of the chromatographic method on biological samples of blood.

DESIGN:

Experimental study

SETTINGS:

Laboratory of toxicology, Department of pathology, medicine and cytology, University Hospital of Split.

MATERIALS AND METHODS:

Lamotrigine, phenobarbital and carbamazepine solutions were prepared and the appropriate mobile phase was mixed, by mixing the buffer, methanol and acetonitrile in various ratios. The parameters for selecting the optimal method for simultaneous determination of all three

antiepileptics using the HPLC method were investigated, including a change of wavelength (306 nm, 270 nm and 220 nm), temperature (30 ° C and 40 ° C) and mobile phase flow (0.5 - 1.4 mL / min). Biological blood samples, supplemented with drug solutions, were extracted by liquid-liquid (LLE) method and injected into an HPLC device.

RESULTS:

HPLC analysis has successfully demonstrated the presence of lamotrigine on all three wavelengths investigated, with the most pronounced response at wavelength of 270 nm, while the presence of phenobarbital is only proved when measuring at wavelength 270 nm. For that reason, the wavelength of 270 nm was selected for further testing of carbamazepine, whose presence under these conditions has been successfully proved. Adapting the mobile phase flow shortened the dead time of the analysis. By applying the developed method to real biological blood samples simultaneously, all three antiepileptics tested were determined.

CONCLUSION:

High performance liquid chromatography was successfully used for simultaneous determination of three antiepileptics: lamotrigine, phenobarbital and carbamazepine. An optimal method and parameters for qualitative and quantitative analysis of three antiepileptics were determined separately and in biological samples. It is of great importance to develop methods for determining the concentration of antiepileptics mainly due to adaptation of patient therapy. For further research it is recommended to use a greater number of antiepileptics to determine the most efficient and quickest method applicable to daily laboratory work.

10. ŽIVOTOPIS

Romana Lijić rođena je 29. travnja 1994. godine u Splitu. S odličnim uspjehom završava Osnovnu školu „Spinut“ te opću gimnaziju Marko Marulić u Splitu. 2012. godine upisuje Integrirani preddiplomski i diplomski studij farmacije Sveučilišta u Splitu. Stručno osposobljavanje završava u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, u ljekarničkoj jedinici Marjan s izvrsnim preporukama. Osnovnu glazbenu školu završila je u Glazbenoj školi Josipa Hatzea u Splitu. Zadnje tri godine aktivno pjeva s poznatim splitskim Bravo Bandom. Tečno govori, piše i služi se engleskim jezikom.