

# ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE LAMOTRIGINA U SERUMA PRIMJENOM HPLC METODE

---

**Punda, Ivana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2014**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split / Sveučilište u Splitu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:128976>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-06-23**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Ivana Punda**

**ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE  
LAMOTRIGINA U SERUMU HPLC  
METODOM**

**Završni rad**

Split, 2014.

SVEUČILIŠTE U SPLITU  
Podružnica  
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Ivana Punda**

**ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE  
LAMOTRIGINA U SERUMU HPLC  
METODOM**

**Završni rad**

Mentor:  
**Prof.dr.sc. Davorka Sutlović**

Split, 2014.

## *Zahvala*

*Zahvaljujem mentorici Prof.dr.sc. Davorki Sutlović na pomoći i susretljivosti koja mi je pružena prilikom izrade ovog rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima na bezuvjetnom razumijevanju i podršci pruženoj tijekom ove tri godine studiranja.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. OPĆENITO O ANTIEPILEPTICIMA .....	1
1.2. NAJČEŠĆE KORIŠTENI ANTIEPILEPTICI .....	3
1.2.1. Fenitoin.....	3
1.2.2. Karbamazepin.....	3
1.3. ANTIEPILEPTICI NOVE GENERACIJE.....	4
1.3.1. Gabapentin i pregabalin .....	4
1.3.2. Vigabatrin.....	5
1.3.3. Lamotrigin.....	6
1.3.3.1. Farmakokinetika i metabolizam lijeka .....	6
1.3.3.2. Apsorpcija i distribucija.....	7
1.3.3.3. Interakcije lijeka .....	7
1.3.3.4. Indikacije i način uporabe.....	9
1.3.3.5. Nuspojave .....	10
1.4. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE LAMOTRIGINA U SERUMU.....	11
1.4.1. Imunološke metode određivanja antiepileptika.....	11
1.4.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC.....	11
1.4.2.1. Pumpe za HPLC .....	13
1.4.2.2. Injektor.....	13
1.4.2.3. HPLC kolone .....	13
1.4.2.4. Detektori za HPLC sustave.....	13
1.4.3. Kvantitativna analiza.....	16
2. CILJ RADA .....	18
3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1. VAĐENJE I POHRANA UZORAKA .....	19
3.2. PRIPREMA STANDARDNIH OTOPINA .....	20
3.2.1. Priprema lamotrigina.....	20
3.2.2. Priprema internog standarda imipramina .....	22
3.2.3. Priprema standarda za kalibraciju .....	22
3.3. EKSTRAKCIJA.....	23
3.4. ANALIZA NA HPLC INSTRUMENTU .....	23
3.5. PRIKUPLJANJE I OBRADA PODATAKA .....	24
4. REZULTATI .....	25
5. RASPRAVA .....	31
6. ZAKLJUČAK.....	33
7. LITERATURA .....	34
8. SAŽETCI.....	36
8.1. Sažetak .....	36
8.2. Abstract.....	37
9. ŽIVOTOPIS.....	38

# 1. UVOD

Prema nekim statističkim pokazateljima od epilepsije u svijetu boluje oko 50 milijuna stanovnika, što je svakako čini jednom od najčešćih kroničnih neuroloških bolesti (1). Epilepsija je bolest koju karakterizira pojava spontanih napadaja različitih oblika, a nastaju zbog epizoda električnog izbijanja neurona. Može se razviti zbog oštećenja mozga nakon tumora, traume ili infekcije te zbog drugih neuroloških bolesti. Suvremeni antiepileptici učinkoviti su u kontroli napadaja, ali nuspojave ograničavaju njihovu upotrebu. Budući da bolesnici te lijekove troše redovito tijekom više godina, važno je da imaju što manje nuspojava. Tijekom posljednjih 20 godina, redovito praćenje koncentracije antiepileptika u krvi postalo je važan dio terapije epilepsije. Naime, postoji veliki broj razloga za rutinsko praćenje koncentracije antiepileptika u serumu pacijenata kao što su primjerice provjera uzima li pacijent redovito terapiju, potvrda da je primjenjeni lijek u okviru terapijskog opsega ili u slučaju promjene doze lijeka. S obzirom da je terapija epilepsije dugoročna, važno je da se izbjegnu koncentracije lijeka koje bi mogle dovesti do nepoželjnih, toksičnih efekata.

Očito je da su nam potrebni specifičniji i učinkovitiji antiepileptici pa su u kliničku upotrebu nedavno uvedeni lijekovi četvrte generacije. Lamotrigin je lijek koji spada u „novije“ antiepileptike i svakako je postao jedan od lijekova bez kojih je danas nemoguće zamisliti liječenje epilepsije (2). Ovaj lijek također zahtijeva redovito, rutinsko određivanje koncentracije iz seruma, a upravo je u analitičkom pogledu HPLC metoda posebno značajna za detekciju lamotrigina u kliničkim laboratorijima. Primjenom ove metode, s druge strane, moguće je dobiti kromatograme i kvantitativno odrediti ne samo lamotrigin, već i mnoge druge antiepileptike.

## 1.1. OPĆENITO O ANTIEPILEPTICIMA

Antiepileptike možemo podijeliti u dvije osnovne skupine s obzirom na početak uporabe. Dobro poznati antiepileptici koji se već dugo rabe su fenitoin, karnbamazepin, valproat, etosuksimid i fenobarbiton (1). Općenito govoreći, ovi lijekovi imaju kompleksnu farmakokinetiku i nemaju širok spektar djelovanja s obzirom na tip

epilepsije. Učinkovitost im je dosta dobra, no uporaba je u velikoj mjeri ograničena pojavom interakcija i nuspojava poglavito povećanjem doze lijeka. Drugu skupinu čine „noviji“ antiepileptici gabapentin, lamotrigin, felbamat, tiagabin i topiramet. Odlikuju se boljim farmakokinetičkim osobinama, imaju širi terapijski raspon, manje nuspojava, a kliničke studije ukazuju na manju učinkovitost kod novodijagnosticiranih parcijalnih epilepsija (2).

Antiepileptici se uglavnom uzimaju oralnim putem i da bi djelovali svi moraju dospjeti u središnji živčani sustav tj. moraju proći hemato-encefalnu barijeru. Slabo su topljivi u vodi, a apsorpcija im je dobra ( 80 – 100% dospijeva u cirkulaciju ). Dobro se raspadaju u tkivima i imaju spori klirens, pa im je vrijeme djelovanja dugo.

Neki lijekovi su i induktori CYP450 enzima u jetri, te je zbog toga potreban i veći oprez pri terapiji. Lijekovi s produljenim otpuštanjem imaju prednost u izboru za terapiju. Antiepileptici ostvaruju učinak na tri načina: pojačavanjem učinka gama amino maslačne kiseline, GABA-e, reduciranjem provodljivosti natrijevih kanala te reduciranjem provodljivosti kalcijevih kanala.

Fenobarbiton i benzodiazepini djeluju na aktivaciju  $GABA_A$ -receptora i na taj način pojačavaju otvaranje kloridnih kanala. Veliki broj antiepileptika (fenitoin, karbamazepin, valproat, lamotrigin) utječu na membransku ekscitabilnost preko voltažnih natrijevih kanala koji su bitni za stvaranje akcijskog potencijala [4]. Njihovo blokiranje pokazuje tzv. ovisnost o uporabi. Etosuksimid, valproat i klonazepam blokiraju T-tip kalcijevih kanala koji sudjeluju u stvaranju ritmičnog izbijanja tijekom apsansa.

## 1.2. NAJČEŠĆE KORIŠTENI ANTIEPILEPTICI

### 1.2.1. Fenitoin

Fenitoin je najstariji nesedativni antiepileptik. Vrlo je učinkovit u reduciranju intenziteta konvulzija izazvanih električnom strujom. Dobro se apsorpira peroralno, a oko 80 % lijeka se veže za albumin te postiže jednaku koncentraciju u središnjem živčanom sustavu kao i u plazmi. Veći dio se metabolizira u jetri i izlučuje urinom kao glukuronid. Fenitoin može stupiti u interakciju s mnogim lijekovima (sulfonamidi, salicilati, valproat) koji ga mogu istisnuti i dovesti do povećanja koncentracije slobodnog lijeka u plazmi (2). Rezultat tog učinka je nepredvidiv jer se povećanjem slobodne frakcije lijeka povećava i njegov klirens.

Raspon koncentracija unutar kojih fenitoin djeluje terapijski prilično je uzak ( približno 40-100  $\mu\text{mol/l}$  ). U praksi se rabi radioimunološko određivanje koncentracije fenitoina u plazmi, što bitno pomaže u postizanju optimalnog terapijskog učinka. Nepoželjni učinci ovoga lijeka nastupaju pri koncentracijama većim od 100  $\mu\text{mol/l}$ . U blaže nuspojave ubrajamo vrtoglavicu, ataksiju, nistagmus, hirutizam.

Kod dugotrajne primjene javlja se hiperplazija desni s padom serumskih koncentracija folne kiseline te se može javiti megaloblastična anemija (2).

Unatoč brojnim nuspojavama i nepredvidivoj farmakokinetici, fenitoin se često rabi jer je djelotvoran kod raznih oblika epileptičnih napadaja.

### 1.2.2. Karbamazepin

Karbamazepin je derivat tricikličkih antidepresiva koji inhibira konvulzije izazvane električnom strujom (1). Ima sličan farmakološki profil kao fenitoin, ali pokazuje manje nepoželjnih učinaka. Djelotvoran je za većinu tipova epilepsije (osim apsansa), ali se upotrebljava i u terapiji trigeminalne neuralgije. Apsorpcija lijeka nakon oralne primjene je spora te se sporo distribuira u tkivima.



Vežan je za proteine plazme, ali nisu uočene interakcije s drugim lijekovima. Potrebna je stalna prilagodba doze jer se poluvijek eliminacije prvih nekoliko tjedana smanjuje sa 36 sati na 8-12 sati.

Kod statusa epilepticusa ispituje se i rektalna primjena lijeka koja se pokazala sigurna i učinkovita kao dugodjelujuća terapija (2). Blokira natrijske kanale i suzbija izbijanja akcijskih potencijala u neuronima. Karbamazepin izaziva različite nuspojave koje ovise o dozi, pa se tako mogu pojaviti pospanost, vrtoglavica, ataksija kao i ozbiljni poremećaji motorike. Liječenje se obično započinje malom dozom koja se postupno povećava da se izbjegne pojava toksičnosti.

Ovaj antiepileptik snažno inducira jetrene mikrosomalne enzime i tako ubrzava metabolizam brojnih drugih lijekova npr. fenitoina, oralnih kontraceptiva i kortikosteroida . Zbog toga su razvijeni novi spojevi okskarbazepin i eslikarbazepin koji ne dovode do interakcija, a učinci su im vrlo slični.

Usprkos svemu, danas je karbamazepin jedan od najčešće korištenih antiepileptika, a upotrebljava se i u terapiji manično-depresivne bolesti (2).

### **1.3. ANTIEPILEPTICI NOVE GENERACIJE**

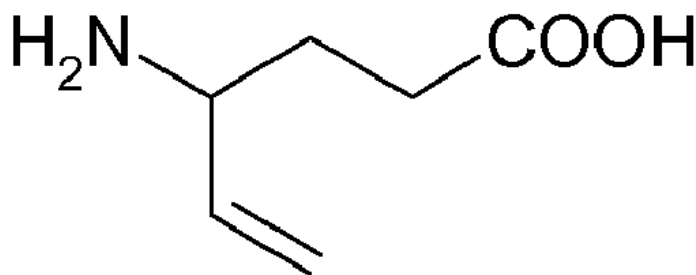
#### **1.3.1. Gabapentin i pregabalin**

Gabapentin je antiepileptik koji djeluje kao analog GABA-e te prolazi kroz krvno-moždanu barijeru. Ne djeluje na GABA receptore niti na natrijske kanale, ali djelujući na N-tip voltažnih kalcijevih kanala smanjuje otpuštanje glutamata (1). Gabapentin se pri visokim dozama apsorbira iz probavnog trakta nelinearno, a eliminacija je linearna. Njegova apsorpcija ovisi o transporteru za L-aminokiseline koji pokazuje svojstvo zasićenja. Ta činjenica da se pri visokim dozama zasićuje nosač čini ga sigurnijim za primjenu jer pojava štetnih učinaka kod predoziranja je teško dostižna. Zbog toga je gabapentin relativno siguran lijek, s malo opasnošću od nastanka nuspojava kad se uzme u prevelikoj dozi (2). Nema interakcija s drugim lijekovima te se izlučuje nepromijenjen urinom. Poluvijek eliminacije je 5- 8 sati pa se mora primjenjivati dva do tri puta na dan (3). Uglavnom se rabi kao dodatak nekom drugom lijeku.

Pregabalin se ne metabolizira u jetri i izlučuje se nepromijenjen mokraćom. Nije vezan za proteine plazme i drugi lijekovi ne utječu na njegovu farmakokinetiku. Također se primjenjuje dva do tri puta na dan zbog poluvijeka eliminacije od 4 – 7 sati. Za razliku od gabapentina, pregabalin je potentniji (2).

### 1.3.2. Vigabatrin

Vigabatrin je prvi novi, poboljšani antiepileptik sintetiziran s namjerom da inhibira GABA-transaminazu te povećá sadržaj GABA-e u cerebrospinalnom likvoru. Iako ima kratak poluvijek eliminacije, izaziva dugotrajan učinak jer ireverzibilno blokira enzim te se može dati peroralno jednom na dan. Najčešće se koristi kod infantilnog spazma koji ne reagira na druge antiepileptike (2). Međutim, vigabatrin uzrokuje neke ozbiljnije nuspojave kao što su pojava depresije, psihotične promjene ponašanja te nepovratno oštećenje mrežnice oka. Unatoč svemu, vigabatrin će vjerojatno dovesti do napretka u liječenju jer je učinkovit kod svih tipova epilepsije, a naročito u pacijenata u kojih drugih lijekovi ne djeluju (1).

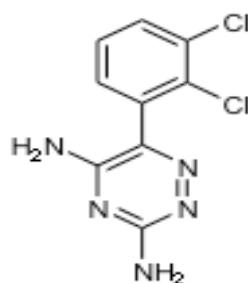


Slika 1. Kemijska struktura vigabatrina

### 1.3.3. Lamotrigin

#### 1.3.3.1. Farmakokinetika i metabolizam lijeka

Lamotrigin spada u skupinu novijih antiepileptika koji se koriste za liječenje epilepsije i bipolarnog poremećaja. Po farmakološkom djelovanju sličan je karbamazepinu i fenitoinu jer djeluje na natrijske kanale i inhibira otpuštanje ekscitacijskih aminokiselina (4). Lamotrigin ima širi terapijski spektar jer je učinkovit i u liječenju bipolarnog poremećaja. Kod odraslih i djece starije od 13 godina može se koristiti samostalno ili u kombinaciji s drugim lijekovima za liječenje epilepsije pa tako u kombinaciji s valproatom dolazi do porasta terapijske učinkovitosti. Lamotrigin je poznat kao inhibitor dihidrofolat-reduktaze te kod peroralnog uzimanja istog u trudnica se smanjuju zalihe folata u organizmu (6). Osim toga, dokazano je da se nakuplja u bubrezima osobito kod muške populacije te uzrokuje nefritis (4). Lamotrigin se veže i na tkiva koja sadrže melanin (pigmentirana koža).



Lamotrigin

Slika 2. Kemijska struktura lamotrigina

### **1.3.3.2. Apsorpcija i distribucija**

Nakon oralne primjene vrlo brzo se i potpuno apsorbira te bioraspoloživost nije pod utjecajem hrane. Maksimalna koncentracija lijeka se postiže 1 do 8 sati nakon primjene. Podaci in vitro istraživanja pokazali su kako se 55% lamotrigina veže za proteine plazme što nije klinički značajno i ne utječe na prisutnost terapijskih koncentracija fenitoina, fenobarbitala ili valproata koji se također natječu za vezno mjesto na proteinima (5).

### **1.3.3.3. Interakcije lijeka**

Budući da se lamotrigin metabolizira konjugacijom glukuronske kiseline, lijekovi koji inhibiraju glukuronidaciju mogu utjecati na klirens istog. Pokazalo se da karbamazepin, fenitoin i fenobarbital te oralni kontraceptivi i rifampin povećavaju klirens lamotrigina (7). Međutim, valproat smanjuje njegov klirens tj. udvostručuje poluživot eliminacije lamotrigina. Stoga je potrebno reducirati dozu istoga ukoliko pacijent istodobno uzima i valproat.

Hormonski kontraceptivi (kao što je kontracepcijska pilula) mogu utjecati na način kako djeluje lamotrigin iako nije vjerojatnost da će isti smanjiti njihovu djelotvornost (7).

Tablica 1

Prikaz interakcija lijekova s lamotriginom (7)

Lijek	Koncentracija lijekova u plazmi u prisutnosti lamotrigina	Koncentracija lamotrigina u plazmi u prisutnosti lijekova
<b>Fenitoin</b>	↔	↓
<b>Karbamazepin</b>	↔	↓
<b>Valproat</b>	↓	↑
<b>Olanzapin</b>	↔	↔
<b>Rifampin</b>	nije ocjenjivano	↓

↔ - nema značajnijeg utjecaja

↓ - smanjenje koncentracije i učinka

↑ - povećanje koncentracije

Antiepileptici, posebno prve generacije (fenitoin, karbamazepin, valproat) imaju veliki potencijal za stupanje u klinički značajne interakcije s lamotriginom te smanjuju ili povećavaju njegovu koncentraciju i učinkovitost.

### 1.3.3.4. Indikacije i način uporabe

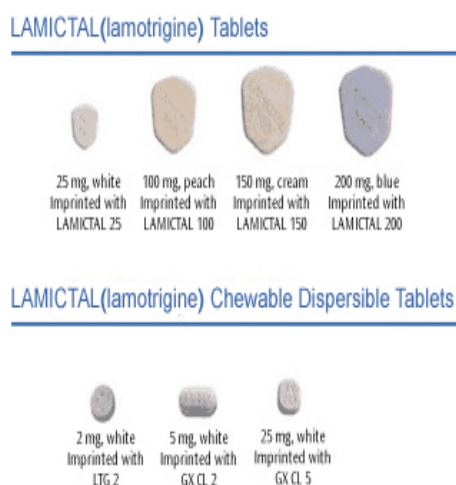
Doza lamotrigina koja se uzima ovisi o dobi, o tome da li se uzima istovremeno s drugim lijekovima te da li pacijent ima problema s jetrom i bubrezima (6). Nikada se ne smije uzimati više doza nego što je propisano.

#### *Epilepsija*

Kod odraslih i djece iznad 12 godina života uobičajena doza iznosi 100 do 400 mg na dan, u jednoj ili podijeljeno u dvije jednake doze. Kod početka liječenja najprije slijedi manja doza koja se postupno povećava kroz nekoliko tjedana. Što se tiče djece (od 2 do 12 godina života) uobičajena doza za kontrolu epilepsije iznosi 1-15 mg/kg tjelesne težine djeteta na dan (7). Za mlađu djecu prikladnije su Lamictal tablete za žvakanje/tablete za oralnu suspenziju.

#### *Bipolarni poremećaj*

Lamictal se također koristi za liječenje bipolarnog poremećaja kako bi se odgodilo vrijeme pojave depresije te manije, ali nije preporučljiv osobama mlađim od 18 godina (4). Samom lijeku je potrebno neko vrijeme kako bi počeo djelovati tako da neće odmah nastupiti poboljšanje.



Slika 3. Lamictal tablete



Slika 4. Lamictal tablete

### 1.3.3.5. Nuspojave

Većina ljudi koja uzima ovaj lijek nema nekakvih nepoželjnih učinaka. Međutim, prije početka terapije pacijent bi trebao biti upućen da alergijske reakcije ili drugi simptomi preosjetljivosti (vrućica, limfadenopatija) mogu najaviti ozbiljan medicinski događaj te je potrebno odmah obavijestiti liječnika. Vjerojatnije je da će se ovi simptomi pojaviti tijekom prvih nekoliko mjeseci liječenja Lamictalom, osobito ako je početna doza previsoka ili ako se doza povisuje prebrzo, ili ako se lijek uzima s valproatom (7). Najčešće se kao simptomi ovih reakcija pojavljuju osip ili crvenilo na koži, ulceracije u ustima, grlu ili nosu, crvene i natečene oči, visoka temperatura, glavobolja te neočekivano krvarenje ili pojava modrica (2). Stoga je potrebno na vrijeme prepoznati ove nuspojave kako ne bi došlo do višestrukog zatajenja organa. Malen broj ljudi liječenih antiepilepticima kao što je Lamictal također je imao misli o samoozljeđivanju ili samoubojstvu osobito kod bipolarnog poremećaja i zato je vrlo važno na vrijeme se obratiti liječniku (7).



Slika 5. Glavobolja

## **1.4. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE LAMOTRIGINA U SERUMU**

### **1.4.1. Imunološke metode određivanja antiepileptika**

Određivanje koncentracije antiepileptika u serumu do nedavno se zasnivalo na imunološkim metodama. Prednost ove metode upravo leži u njenoj jednostavnosti i relativnoj brzini. No, često zbog nespecifičnosti antitijela u odnosu na metaboličke produkte koji se uz lijek nalaze u plazmi, nije moguće određivanje točne koncentracije. Već je neko vrijeme poznat značaj klinički važnih metabolita karbamazepina u pogledu izazivanja neželjenih učinaka. Imunološke metode koje su do sada bile u upotrebi za određivanje antiepileptika ne mogu se koristiti za određivanje karbamazepin-10,11-epoksida zato što ne postoji komercijalno proizvedeno antitijelo koje je selektivno prema ovom metabolitu (12). Činjenica je da se u brojnim metodama zasnovanim na vezivanju antitijela pojavljuje ukrštena reakcija između antitijela i metabolita, a shodno tome i značajna greška u pogledu određivanja koncentracije antiepileptika.

### **1.4.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC**

Kromatografija obuhvaća laboratorijske tehnike za razdvajanje smjese, u kojima ispitivana komponenta, otopljena u mobilnoj fazi, prolazi kroz stacionarnu fazu, prilikom čega se dijelovi smjese razdvajaju i moguće ih je kvalitativno, ali i kvantitativno odrediti (8).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*eng. High-Performance Liquid Chromatography- HPLC*) počinje se razvijati u kasnim 1960.-im kada i postaje komercijalno dostupna (10). Nakon 1990. Primjena HPLC-a naglo se širi. Ovo je danas jedna od široko prihvaćenih separacijskih metoda za analizu različitih vrsta uzoraka zahvaljujući brzini i vrlo niskom pragu detekcije koji se kreće u nanomolima.

HPLC je proces u kojem mobilna faza različitom brzinom prolazi kroz kromatografsku kolonu i dolazi do kvantitativnog razdvajanja komponenata.



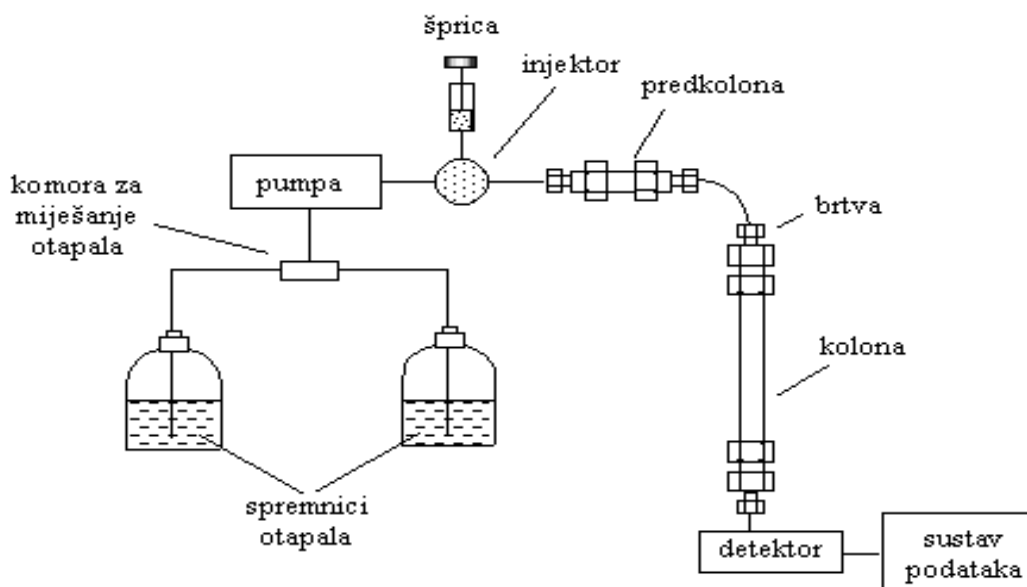
Koristi se za odjeljivanje složenih smjesa, a njene prednosti naspram ostalim tehnikama su brza separacija te visoka osjetljivost i rezolucija.

Osnovne faze HPLC-a :

- donošenje uzorka na kolonu
- razdvajanje komponenata smjese na koloni
- detekcija razdvojenih komponenti i kvantifikacija

HPLC sustav sastavljen je od sljedećih dijelova:

1. Spremnik pokretne (mobilne) faze
2. Pumpe za stalan protok mobilne faze kroz kolonu
3. Injektor za unošenje tekućeg uzorka
4. HPLC kolone
5. Detektor s pisačem i računalom



Slika 6. Shematski prikaz HPLC uređaja

#### **1.4.2.1. Pumpe za HPLC**

Pumpe omogućuju stalan protok pokretne faze stalnom brzinom i pod visokim tlakom u kolonu. Moraju osiguravati ponovljive volumene eluiranja te površine pikova bez obzira na začepjenost kolone i promjenu viskoznosti. Raspon protoka kod modernih pumpi je od 0,01 do 10 mL/min, a maksimalan tlak kojeg postižu je 34 500 kPa (10).

#### **1.4.2.2. Injektor**

Injektor služi za injektiranje tekućeg uzorka različitih volumena (0,1-100 mL) pri visokom tlaku (10). Najčešće se za injektiranje koriste ventili, ali se mogu koristiti i igle. Rheodyne ventil omogućuje brzo i reproducibilno injektiranje različitih volumena uzoraka. U njega uzorak ulazi kroz vanjsku čeličnu petlju te okretanjem dio petlje napunjen uzorkom struja mobilne faze nosi na početak kolone.

#### **1.4.2.3. HPLC kolone**

Kolone mogu biti staklene ili čelične, obložene čelikom ili polieter eter ketonom. Obično su dugačke 250mm, unutarnjeg promjera 4,6 mm te napunjene stacionarnom fazom s vrlo sitnim česticama veličine 3-10 $\mu$ m (9). Pri samom izboru kolone treba obratiti pažnju na dimenzije kolone i veličinu čestica stacionarne faze koje su najčešće na bazi siloksana (10). Vrlo je važno pravilno koristiti HPLC kolone čime se ujedno produžuje njihov vijek trajanja. Ukoliko se ispituju jako kiseli uzorci, ona se brže uništava.

#### **1.4.2.4. Detektori za HPLC sustave**

U HPLC sustavima najčešće se koriste optički detektori koji propuštaju zraku svjetlosti koja na putu do ćelije prolazi kroz efluent koji izlazi iz kolone. Dolazi do promjene u intenzitetu zrake svjetlosti i to se detektira kao promjena izlaznog napona koja se snima i šalje u računalo. Tako dobivamo podatke o retencijskom vremenu i površini pika.

U analizi lijekova i droga najčešće se koriste **UV/VIS detektori** koji mjere apsorpciju UV ili vidljivih zraka, a promjene u apsorpciji razmjene su koncentraciji prema Lambert-Beerovom zakonu (10). Ranije su ovi detektori mjerili apsorpciju samo na 254 nm dok je danas omogućeno podešavanje bilo koje valne duljine u UV/VIS području.

Također, širok opseg linearnosti omogućava istovremeno određivanje određene supstancije u tragovima te visoke koncentracije druge supstancije što je od velikog značaja u istovremenoj analizi više lijekova. Ovim detektorima ne smetaju male fluktuacije protoka i temperature, ne uništavaju uzorak te su dovoljno osjetljivi za mnoge spojeve.

**Dioda array detektor, DAD** je noviji i bolji tip UV detektora koji kao izvor svjetlosti koristi deuterijevu i volframovu lampu. Svaka dioda prepoznaje točno određenu valnu duljinu tako da se zapravo sve mjere istodobno. Ovim načinom povećana je rezolucija UV spektra, ali je niža osjetljivost jer su diode osjetljive na manje količine zračenja. Prednosti ovog detektora su u tome što omogućuje istovremenu detekciju dviju valnih duljina i računanje apsorpcijskog omjera kojim procjenjujemo čistoću pika (9,10). Također, zahvaljujući poznavanju ciljanog spektra moguće je ukloniti interferirajući spektar te dobiti pouzdanu kvantifikaciju.

**Detektor refrakcijskog indeksa, RI** najmanje je osjetljiv detektor koji registrira promjenu refrakcijskog indeksa zbog prisutnosti spoja u efluentu. Potrebno je naglasiti da tijekom rada može doći do promjene refrakcijskog indeksa zbog temperature i tlaka te je potrebno redovito kontrolirati te parametre.

**Fluorescentni detektor** može postići vrlo dobro selektivnost. Detekcija komponente koja fluorescira zasnovana je na emisiji fluorescencije koja je praćena ekscitacijom na određenoj valnoj duljini. Vrlo je važno odabrati dobru tekuću fazu te paziti na pH sistema jer neki spojevi fluoresciraju samo u određenim ionskim formama.

**Elektrokemijski detektor** radi na principu oksido-redukcijskih procesa. Mjeri naboj koji je posljedica elektrolitičke oksidacije ili redukcije analita na površini elektrode. Ima vrlo visoku osjetljivost i selektivnost. Postoje dva tipa, kolorimetrijski i amperometrijski (10). Oba imaju gotovo istu osjetljivost. Kolorimetrijski ima veliku površinu elektroda na kojima se elektrokemijska reakcija odvija do kraja, a amperometrijski ima male elektrode s niskim stupnjem pretvorbe.



Slika 7. HPLC uređaj iz Kemijsko-toksikološkog laboratorija KBC-a Split

### 1.4.3. Kvantitativna analiza

Osnova kvantitativne analize u kromatografiji je mjerenje površine odnosno visine pika. Ako su pikovi dobro razdvojeni, i površina i visina pika su razmjerni koncentraciji. Postoje tri kalibracijske metode:

- Metoda eksternog standarda
- Metoda internog standarda
- Metoda dodanog standarda

**Metoda eksternog standarda** je najjednostavnija, a njena pouzdanost ovisi o ponovljivosti injektiranja volumena uzorka (10). Potrebno je pripremiti seriju standarda poznatih koncentracija te potom odabrati koncentracije koje su u koncentracijskom području analita. Koncentracija traženog analita određuje se prema formuli:

$$C_{analita} = (P_{analita} / P_{standarda}) \times C_{standarda}$$

gdje je:

C analita = koncentracija analita

C standarda = koncentracija standarda

P analita = površina pika analita u uzorku

P standarda = površina pika standarda

**Metoda internog standarda** je najpreciznija metoda. Također se priprema serija standarda poznatih koncentracija, ali se u standarde i u nepoznati analit stavlja ista količina internog standarda. On mora imati slično retencijsko vrijeme kao i analit i biti mu kemijski sličan. Interni standard se dodaje na početku, prije same pripreme uzorka i važno je da bude stabilan i da ne interferira s komponentama uzorka (10). Koncentracija nepoznatog analita određuje se prema slijedećoj formuli:

$$C_{\text{analita}} = (P_{\text{int. u analitu}} / P_{\text{int. u standardu}}) \times (P_{\text{analita}} / P_{\text{standarda}}) \times C_{\text{standarda}}$$

gdje je:

$C_{\text{analita}}$  = koncentracija analita

$C_{\text{standarda}}$  = koncentracija standarda

$P_{\text{analita}}$  = površina pika analita u uzorku

$P_{\text{int. u analitu}}$  = površina pika internog standarda dodanog u uzorak

$P_{\text{standarda}}$  = površina pika standarda

$P_{\text{int. u standardu}}$  = površina pika internog standarda dodanog u standard

**Metoda dodanog standarda** učinkovita je kod izbjegavanja interferencija matrice uzorka. Uzorak se podijeli u dva dijela i od toga se u jedan dio doda poznata količina analita i oba se jednako ispituju. Razlika u visini pika predstavlja količinu nepoznatog analita koja se određuje prema formuli:

$$m_{\text{analita}} = m_{\text{standarda}} \times P_{\text{analita}} / (P_{\text{standarda}} - P_{\text{analita}})$$

gdje je:

$m_{\text{analita}}$  = nepoznata masa analita u uzorku

$m_{\text{standarda}}$  = masa standarda dodana u uzorak

$P_{\text{analita}}$  = površina pika analita u uzorku

$P_{\text{standarda}}$  = površina pika analita i dodanog standarda u uzorak

## **2. CILJ RADA**

Cilj ovoga rada je prikazati prednosti primjene HPLC metode- tekućinske kromatografije u kvantitativnom određivanju novijih antiepileptika (lamotrigina) koji se ne mogu odrediti suvremenim imunokemijskim metodama. Na postavljena pitanja nastojat će se odgovoriti upotrebom navedenih metoda i teorija, kao i rezultata istraživanja.

### 3. MATERIJALI I METODE

Pri određivanju koncentracije lamotrigina iz uzorka seruma korištena je HPLC metoda detaljno opisana u važećem protokolu Kemijsko-toksikološkog laboratorija, KBC Split (9).

#### 3.1. VAĐENJE I POHRANA UZORAKA

Određivanje koncentracije lamotrigina najčešće se radi iz seruma. Poželjno je uzeti uzorak krvi za analizu ovoga antiepileptika maksimalno 1,5-5 h nakon posljednje doze. Ovo je preporuka kod analize kontroliranih terapija, a ukoliko se sumnja na neku zlouporabu krv treba odmah analizirati. Uzorak se vadi u epruvetu za biokemijske analize i zatim se centrifugira 15 minuta na 2 600 rpm (9). Izdvoji se serum i pohranjuje se na temperaturi od +4°C za period analize 7 dana, ili na -70°C za duži period.



Slika 8. Epruveta za vađenje uzorka krvi za analizu lamotrigina



## 3.2. PRIPREMA STANDARDNIH OTOPINA

### 3.2.1. Priprema lamotrigina

Osnovni standard lamotrigina LAM<sub>0</sub> koncentracije 2 mg/mL priprema se otapanjem 10mg supstancije lamotrigina LAM u 5 mL metanola. Kako bi dobili standardnu otopinu LAM<sub>1</sub> koncentracije 100 µg/mL potrebno je razrijediti osnovni standard LAM<sub>0</sub> metanolom i to tako, 50 µL LAM<sub>0</sub> + 950 µL metanola. Konačno, drugu standardnu otopinu LAM<sub>2</sub> koncentracije 10 µg/mL dobit ćemo dodavanjem 100 µL LAM<sub>1</sub> u 900 µL metanola. Upravo se ovim načinom dobiju vrijednosti koncentracija koje se nalaze unutar kalibracijske krivulje, a izabrane su jer su očekivane koncentracije lamotrigina u serumu pacijenta unutar ovog raspona.

		<b>Konc.</b>
LAM <sub>0</sub>	10 mg LAM / 5mL metanola	2 mg/mL
LAM <sub>1</sub>	50 µL LAM <sub>0</sub> + 950 µL metanola	100 µg/mL
LAM <sub>2</sub>	100 µL LAM <sub>1</sub> + 900 µL metanola	10 µg/mL



Slika 9. Pripremljena standardna otopina lamotrigina

### 3.2.2. Priprema internog standarda imipramina

Interni standard imipramina IM<sub>0</sub> koncentracije 2mg/mL priprema se otapanjem 100mg imipramina u 50mL vode. Drugi interni standard IM<sub>1</sub> koncentracije 200µg/mL dobit ćemo razrijeđivanjem i to tako da ćemo 1mL IM<sub>0</sub> dodati u 9mL vode.

		<b>Konc.</b>
IM <sub>0</sub>	100 mg IM / 50 mL H <sub>2</sub> O	2 mg/mL
IM <sub>1</sub>	1 mL IM <sub>0</sub> + 9 mL H <sub>2</sub> O	200 µg/mL

### 3.2.3. Priprema standarda za kalibraciju

Priprema standarda za kalibraciju izvodi se prema protokolu prikazanom u tablici.

U standardnu otopinu lamotrigina i uzorke seruma dodaje se poznata, ista količina internog standarda, 10µL.

<b>Red.br.</b>	<b>LAM ( µL )</b>	<b>Serum ( µL )</b>	<b>IM<sub>1</sub> ( µL )</b>	<b>Konc. LAM ( µg/mL )</b>	<b>Konc. IST ( µg/mL )</b>
<b>1</b>	150 LAM <sub>1</sub>	850	10	15	2
<b>2</b>	100 LAM <sub>1</sub>	900	10	10	2
<b>3</b>	50 LAM <sub>1</sub>	950	10	5	2
<b>4</b>	100 LAM <sub>2</sub>	900	10	1	2
<b>5</b>	50 LAM <sub>2</sub>	900	10	0,5	2

### 3.3. EKSTRAKCIJA

1000  $\mu\text{L}$  seruma prebaci se u epruvetu za ekstrakciju te zaluži dodatkom 100  $\mu\text{L}$  1M NaOH. Zatim se doda 5 mL smjese etil-acetata i n-heksana u omjeru 1:1 i snažno promiješa 10 sekundi. Slijedi ekstrahiranje na rotoru za ekstrakciju na 50 rpm u trajanju od 30 minuta. Nakon toga se centrifugira 15 minuta na 2600 rpm i odvoji se 4 mL gornjeg sloja u epruvetu za evaporaciju. Zatim prebacimo epruvetu na evaporator, spojen s dovodom dušika, i namjestimo ga na LOW br.4 ( temperatura oko 37  $^{\circ}\text{C}$  ). Evaporira se u struji dušika dok otapalo potpuno ne ispari. Potom se doda 150 $\mu\text{L}$  destilirane vode u epruvetu kako bi se otopio zaostali talog i uzorak se injektira u duplikatu u HPLC instrument (9).

### 3.4. ANALIZA NA HPLC INSTRUMENTU

Za analizu lamotrigina korišten je HPLC sustav sa pumpom, injektorom i UV-detektorom Laboratorija za sudsku medicinu KBC-a Split tip: LC-10 series.

#### **Kemikalije za mobilnu fazu HPLC-a:**

##### **1. Mobilna faza:**

Metanol (Merck)	25 mL
Acetonitril (Merck)	35 mL
Fosfatni pufer (pH = 6,9) (Merck)	90 mL

##### **2. Fosfatni pufer:**

**A-** otopiti 1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  na 500 mL destilirane vode

**B-** otopiti 1,77 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  na 500 mL destilirane vode

Zatim se pomiješa 250 mL otopine **A** + 250 mL otopine **B**, podesi pH na 6,9 i filtrira na veličine pora 0,45 $\mu\text{m}$  (Milipore)

### **Uvjeti instrumenta za određivanje lamotrigina:**

Vrijeme početka: 4.5 min

Vrijeme završetka: 6.5 min

Injektiranje: 2 Hz

Protok: 2 mL/min

Tlak: min=2 bar; max=250 bar

UV detektor:  $\lambda=306$  nm

Temperatura: 40 °C

### **Kolona:**

Restek; Pinnacle II C18 5  $\mu$ m; 250x4,6 mm

## **3.5. PRIKUPLJANJE I OBRADA PODATAKA**

Prije početka kvantitativne analize uzoraka izrađuje se kalibracijski kromatogram koji sadrži lamotigin. Kako bi to postigli, potrebno je injektirati pripremljenu standardnu otopinu onoliko puta koliko je potrebno da dva uzastopna kromatograma prikažu identično retencijsko vrijeme, rezoluciju pika te površinu ( visinu ) pika. Kromatogram posljednjeg injektiranja koristi se za kalibraciju analitičkog sistema.

Zatim se unose u tablicu dobijeno retencijsko vrijeme i koncentraciju standardne otopine, a za evaluaciju se odabire *metoda internog standarda*. U kalibracijski standard i nepoznate uzorke dodaje se poznata, ista količina internog standarda.

Računalo nam izbacuje odgovarajući pik te se prema formuli ( prethodno navedenoj u poglavlju 3.4.3. Kvantitativna analiza ) izračunava koncentracija lamotrigina.

## 4. REZULTATI

U Laboratoriju za sudsku medicinu KBC-a Split uspostavljen je protokol za HPLC metodu kojom se određivala koncentracija lamotrigina iz seruma. Uzorci su propuštani kroz kolonu HPLC instrumenta pri valnoj duljini od 306 nm i protoku od 2 mL/min.

Najprije su analizirane standardne otopine koncentracija 0,5; 1; 5; 10; 15  $\mu\text{g/mL}$  te potom uzorci. Svaki uzorak injektiran je 4 puta. Korištenjem zadanih radnih uvjeta i navedenih koncentracija standardnih otopina lamotrigina određena je baždarna krivulja za lamotrigin, prikazana na slici 10. Pomoću ove krivulje izračunava se koncentracija lamotrigina i radi se usporedba koncentracija.

Na slici 11. prikazan je karakteristični signal standardne otopine lamotrigina koncentracije 15  $\mu\text{g/mL}$  pri retencijskom vremenu od 5.356 minuta. Primjenom HPLC instrumentalne tehnike postignuta je visoka preciznost što je vidljivo na slici 12. usporedbom signala tri standardne otopine lamotrigina iste koncentracije 15  $\mu\text{g/mL}$ . Slika 13. prikazuje usporedbu signala standarda lamotrigina u istom uzorku seruma, ali različitih koncentracija (1-0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 2-1  $\mu\text{g/mL}$ ; 3-5  $\mu\text{g/mL}$ ; 4-10  $\mu\text{g/mL}$ ; 5-15  $\mu\text{g/mL}$ ). Grafičkim prikazom usporedbe karakterističnih signala standarda lamotrigina navedenih koncentracija pri injektiranju svakog uzorka 4 puta vidi se da je HPLC metodom postignuta vrlo dobra preciznost. Naime, vršci signala i površine za istovjetne koncentracije vrlo dobro se podudaraju, a isto je prikazano na slici 14.

**Podaci za krivulju:**

$$Y = ax + b$$

gdje je:

$$a = 2.373803e-005$$

$$b = 0.0$$

$$R^2 = 0.9998936$$

$$R = 0.9999468$$

**External Standard**

Curve Fit Type: Linear

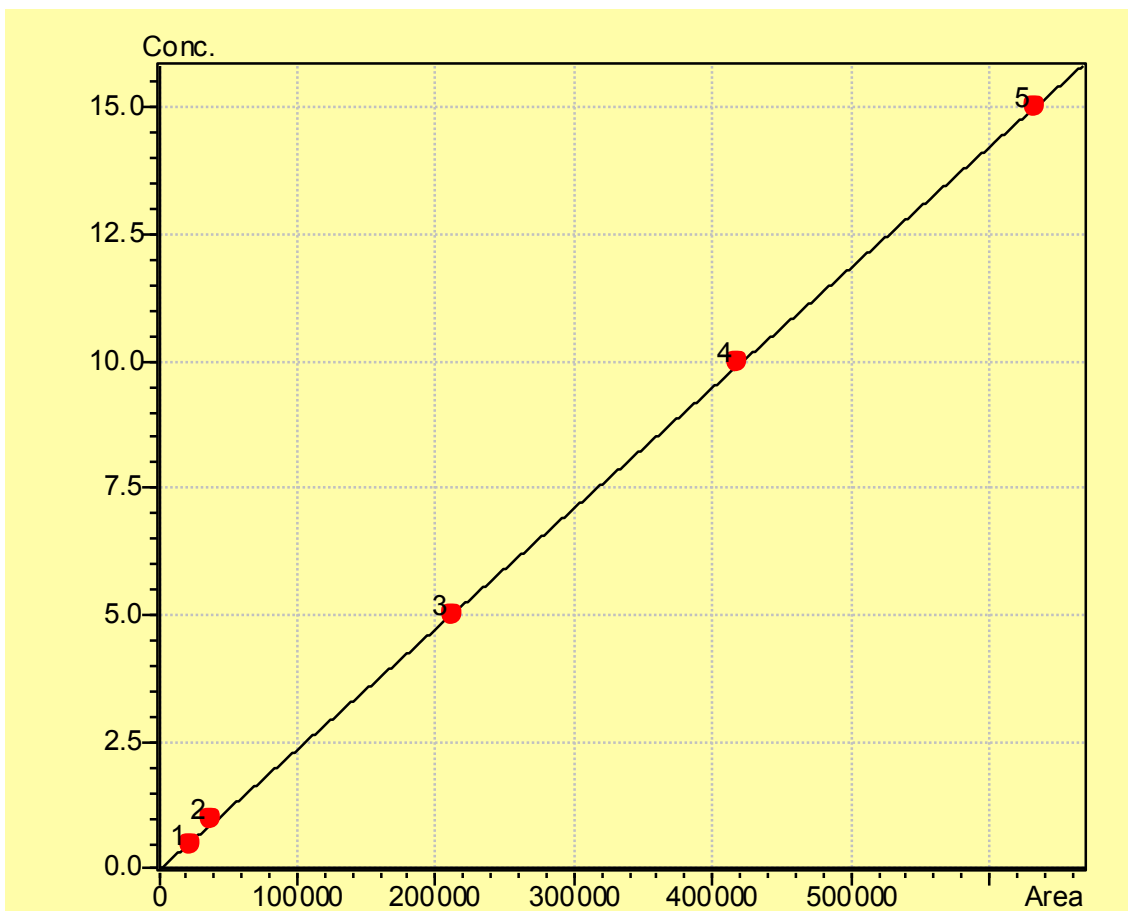
Origin: Force Through

Weight: None

Mean RF: 2.393744e-005

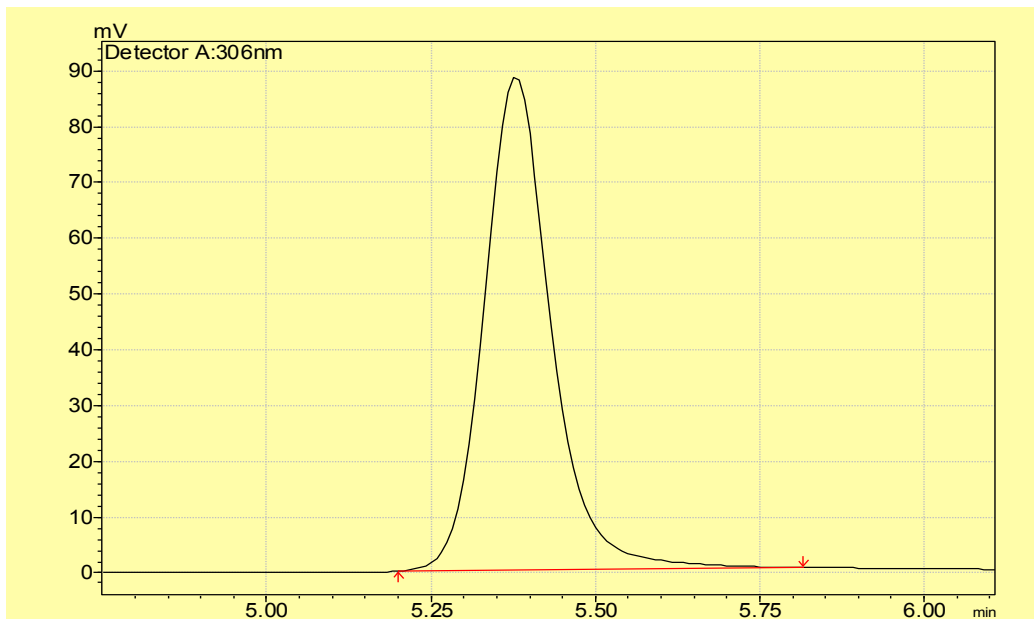
RF SD: 1.608065e-006

RF %RSD: 6.717783



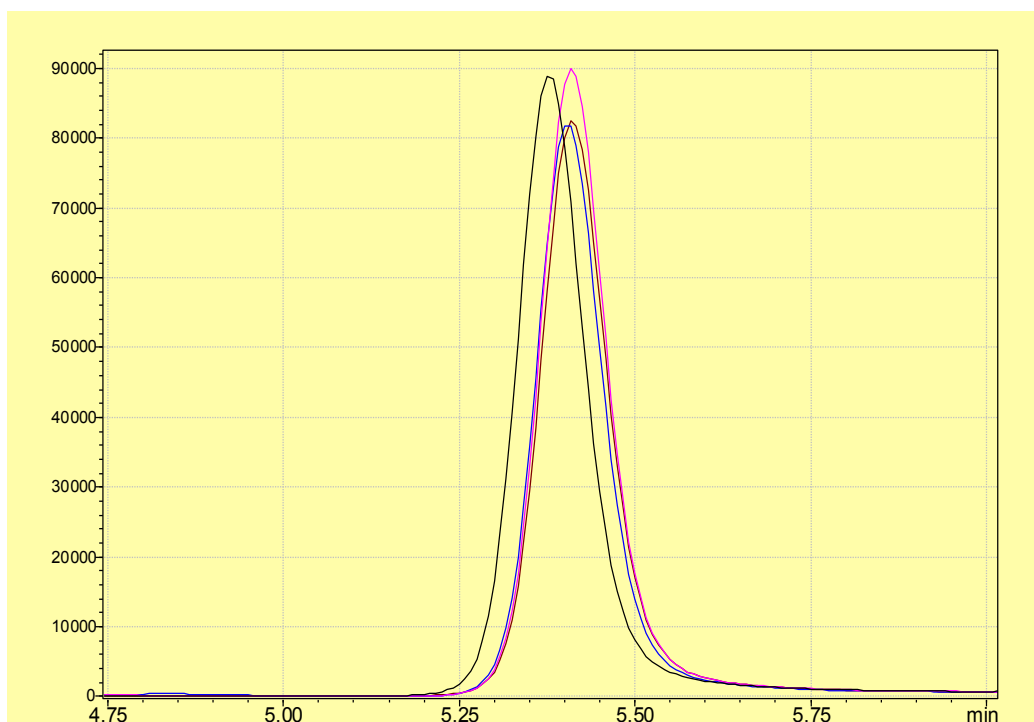
**Slika 10.** Baždarna krivulja za lamotrigin- 5 koncentracija (0,5;1;5;10;15  $\mu$ g/mL)



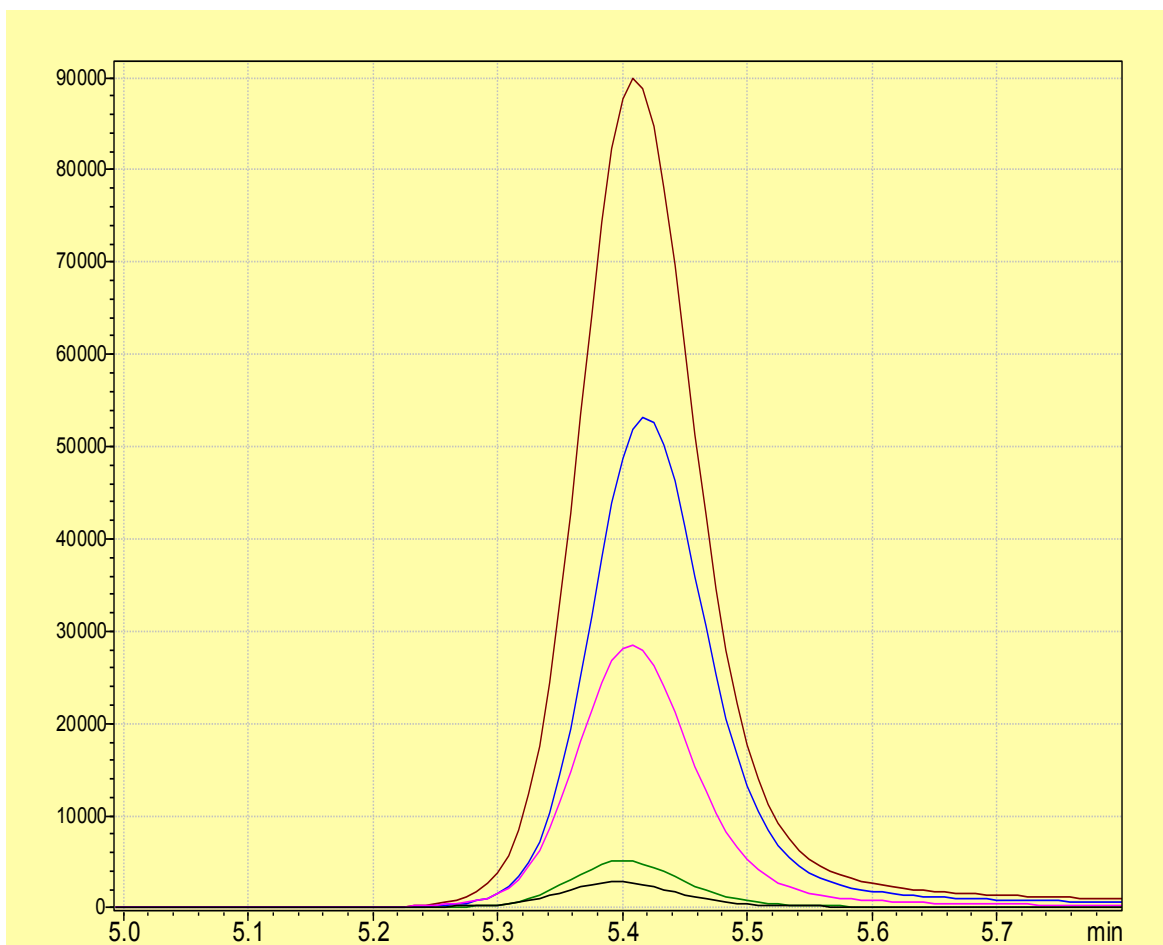


**Slika 11.** Prikaz karakterističnog signala standardne otopine lamotrigina

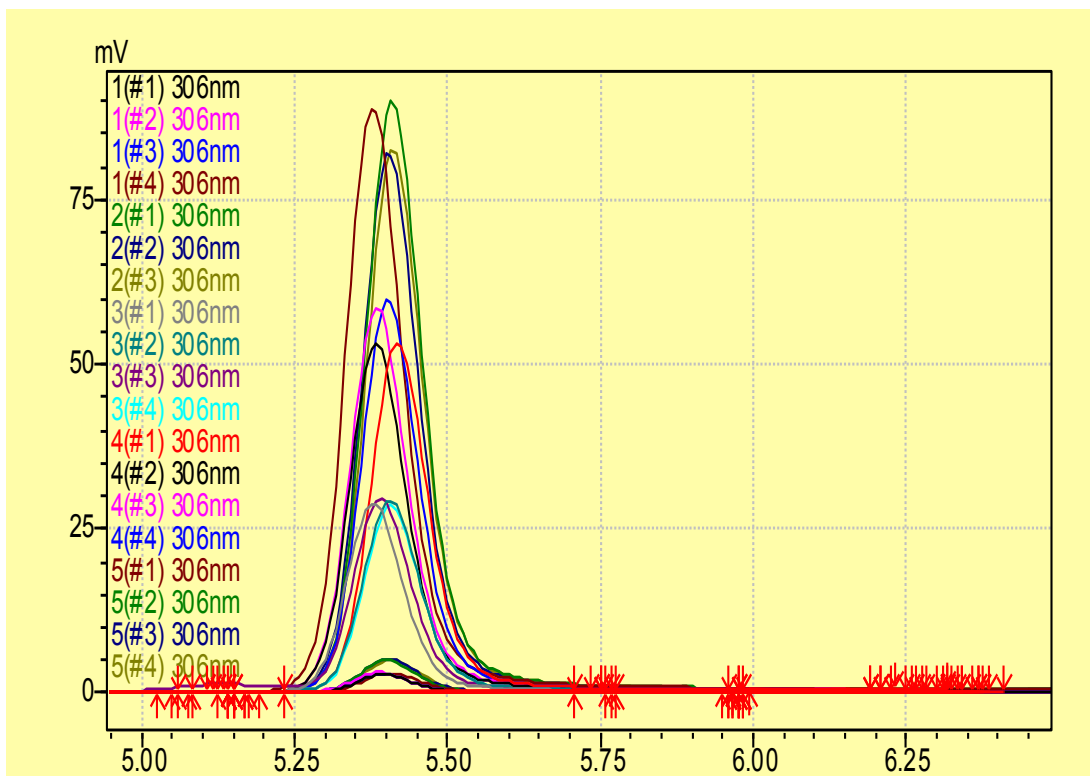
$c=15 \mu\text{g/mL}$



**Slika 12.** Usporedba signala 3 standarda lamotrigina iste koncentracije ( $c=15 \mu\text{g/mL}$ )



**Slika 13.** Prikaz usporedbe signala standarda lamotrigina različitih koncentracija (1-0,5 g/mL; 2-1 g/mL; 3-5 g/mL; 4-10 g/mL; 5-15 g/mL) istog uzorka



**Slika 14.** Prikaz usporedbe karakterističnih signala standarda lamotrigina svih koncentracija u svim uzorcima ( svaki uzorak je injektiran 4 puta )

## 5. RASPRAVA

Danas su u rutinskim kliničkim laboratorijima dostupne različite metode određivanja koncentracije antiepileptika u serumu. No, zahvaljujući razvoju kompletnih analitičkih kitova, tekućinska kromatografija sa UV-detektorom, HPLC najčešće je primjenjivana metoda. U ovom radu prikazana je HPLC-UV metoda za određivanje koncentracije lamotrigina u serumu pacijenata. Uzorci su pripremljeni ekstrakcijom na čvrstim nosačima, SPE čime je znatno skraćeno vrijeme pripreme. Lamotrigin je detektiran na valnoj duljini od 306 nm čime su izbjegnute moguće interferencije iz samo uzorka.

Pri pH od 6,9 dobijen je najbolji kromatografski odgovor.

Contin M., Albani F, Ambrosetto G. i suradnici u svom istraživanju povezali su varijacije u koncentraciji lamotrigina u plazmi sa hormonalnom kontracepcijom kod pacijenata s epilepsijom (13). Određivali su koncentraciju lamotrigina HPLC-UV metodom pri valnoj duljini od 202 nm. Uzorke su pripremili deproteinizacijom sa acetonitrilom i koristili su kiselu mobilnu fazu, pH je iznosio 4,5. Linearnost kalibracijske krivulje njihove metode bila je u opsegu od 2-40 mg/L, a limit detekcije 2 mg/L.

Greiner- Sosanko E. i suradnici za određivanje koncentracije lamotrigina u serumu koristili su tekućinsku i plinsku kromatografiju (14). Detekcija lamotrigina u tekućinskoj kromatografiji određena je pri 270 nm. Ovime su dokazali da su primjenjene metode korisne i jednostavne za rutinsku analizu koncentracije lijeka.

Bompadre S., Tagliabracci A., Battino M. i Giorgetti R. u svom radu određivali su lamotrigin u punoj krvi (15). Uzorke su pripremili ekstrakcijom na čvrstim nosačima, SPE te analizirali HPLC-UV tehnikom pri 260 nm. Koristili su mobilnu fazu koja sadrži fosfatni pufer i acetonitril u omjeru 60:40. Linearnost metode bila je u rasponu koncentracija od 0,2-20 mg/L. Koeficijenti varijacije tijekom dana i iz dana u dan bili su od 1,8 % -6,7 %. Vrijeme trajanja analize iznosilo je 10 minuta.

Angelis Stoforidis P. i suradnici u svom istraživanju određivali su koncentraciju lamotrigina u serumu HPLC-UV metodom na valnoj duljini od 306 nm (16). Priprema uzoraka uključivala je precipitaciju proteina s acetonitrilom. Linearnost kalibracijske krivulje bila je u opsegu od 1-20 mg/L. Limit detekcije iznosio je 0,6 mg/L, a limit kvantifikacije 1 mg/L. U ovoj metodi korištena je ista valna duljina od 306 nm za

detekciju lamotrigina koja je dovoljno visoka da moguće interferencije iz uzorka svede na minimum i bez prethodne deproteinizacije (9).

Prednost metode koju sam opisala u radu u odnosu na prethodno navedene ogleda se u bržoj predanalitičkoj pripremi uzorka pomoću ekstrakcije na čvrstim nosačima koja osigurava veće iskorištenje i daje reproducibilnije rezultate. Valnom duljinom od 306 nm bez prethodne deproteinizacije uzorka eliminiraju se interferencije drugih biomolekula. pH vrijednost mobilne faze od 6,9 daje dobar kromatografski odgovor, a ukupno vrijeme analize znatno je kraće. Ovo je posebno važno u hitnim slučajevima kada je brzo izdavanje pouzdanih rezultata nužno za zdravlje pacijenta. Osim toga, ova metoda je i ekonomski pristupačnija u odnosu na tekućinsku i plinsku kromatografiju s detektorom masa koje su skuplje, ali i složenije. Naglasila bih i da je osjetljivija u odnosu na prethodne metode. Linearnost kalibracijske krivulje je u rasponu od 0,5-15 mg/L te ulazi u opseg terapijskih koncentracija. Sve navedeno ukazuje na zaista zadovoljavajuću ponovljivost metode.

## 6. ZAKLJUČAK

- Terapije epilepsije je, po pravilu, doživotna i kontinuirana primjena lijekova. Upotreba antiepileptika novije generacije, lamotrigina, bilo kao monoterapija ili dio politerapije svakako je postala važan dio terapije u liječenju epilepsije. Zbog toga je nepohodno da se, metodom koja je u analitičkom pogledu odgovarajuća, prati koncentracija lamotrigina u serumu pacijenata.
- Što se tiče same primjene lamotrigina, izdvojila bih da je siguran za primjenu u trudnoći, dakle izbor liječenja trudnica koje imaju napadaje.
- S obzirom na poprilično složenu farmakokinetiku ovog lijeka, terapijski monitoring lijeka igra važnu ulogu u terapiji istog. Kako je lamotigin odobren i u SAD-u te ga liječnici sve više propisuju, određivanje njegove koncentracije u krvi od velike je koristi kliničarima za praćenje terapije.
- Razvijanje dovoljno osjetljive i precizne HPLC-UV metode za terapijski monitoring ovog lijeka postalo je iznimno važno. Opisana metoda je zbog svoje jednostavnosti i brze pripreme uzoraka, visoke valne duljine na kojoj se vrši detekcija te krakog trajanja analize precizna i pouzdana za određivanje koncentracije lamotrigina u serumu.
- Primjenom HPLC metode moguće je dobiti i kromatograme i kvantificirati ne samo lamotigin, već i mnoge druge antiepileptike.

## 7. LITERATURA

1. Hajnšek S., Kovačević I., Petelin Ž. Epilepsija- terapijske smjernice. Zagreb, 2010: broj 1-2
2. Rang H. P. i suradnici. Farmakologija. Zagreb, Golden marketing- Tehnička knjiga,2006
3. LaRoche SM and Helmers SL. The new antiepileptic drugs: Clinical applications JAMA 2004, 291: 615-20.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762041> (27.05.2014.)
4. Goldsmith DR, Wagstaff AJ, Ibbotson T, Perry CM, Lamotrigine: a review of its use in bipolar disorder. Auckland, New Zealand, 2003.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12962521> (27.05.2014.)
5. Steinbaugh L, Szaflarski JP. Adjunctive therapy for the treatment of primary generalized tonic-clonic seizures: focus on oncedaily lamotrigine. Epilepsy Behav.,2010  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=steinbaugh+adjunctive+therapy> (01.06.2014.)
6. Vajda FJ, Dodd S, Hogroan D. Lamotrigine in epilepsy, pregnancy and psychaitry a drug for all sesons. J Clin Neurosci, 2012. S0967-5868  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23036173> (01.06.2014.)
7. GlaxoSmithKline. Using of Lamictal. 2004
8. Vuksanović J. Određivanje lamotrigina u serumu HPLC metodom. Izvorni rad. Beograd, 2001
9. Protokol za određivanje lamotrigina iz uzorka seruma HPLC metodom. Laboratorij za sudsku medicinu, KBC Split
10. Sutlović D i sur. Toksikologija hrane. Split: Redak, 2011
11. Patil KM, Bodhankar SL. Simultaneous deteremination of lamotrigine, phenobarbitone, carbamazepine and phenytoin in human serum by high-performance liquid chromatography. J.Pharm Biomed Anal. 2005, 39 (1-2): 181-6  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Patil+simultaneous+determinatin+of+l> amotrigine ( 24.05.2014.)

12. Uputstvo za HPLC određivanje antiepileptika u serumu/plazmi. Chromsystems, Munchen, 2007
13. Contin M, Mohamed S, Candela C, Albani F, Riva R, Baruzzi A. Simultaneous HPLC-UV analysis of rufinamide, zonisamide, lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 873 (3-4); 461-5  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16182617> (24.05.2014.)
14. Greiner- Sosanko E, Giannoutsos S, Lower DR, Virji MA, Krasowski MD. Drug monitoring: simultaneous analysis of lamotrigine, oxcarbazepine, 10-hydroxycarbazepine and zonisamide by HPLC-UV and a rapid GC method using a nitrogen –phosphorus for levetiracetam. *J Chromatogr Sci*.2007, 45 (9): 616-22  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Greiner+drug+monitoring+lamotrigine> (01.06.2014.)
15. Bompadre S, Tagliabracci A, Battino M i Giorgetti R. Determination of lamotrigine in whole blood with on line solid phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*,2008, 863 (1); 177-80  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Greiner+drug+monitoring+lamotrigine> (03.06.2014.)
16. Angelis –Stoforidis P, Morgan DJ, O'Brien TJ, Vajda FJ. Determination of lamotrigine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci App1*, 1999, 727 (1-2): 113-8  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Angelis-Stoforidis+determination+of+lamotrigine> ( 03.06.2014.)
17. Rusić B i sur. Determination of lamotrigine in human serum by liquid chromatography with ultraviolet detection. *Beograd, Medical Data*,2012; 4 (4): 391-394  
[http://www.md-medicaldata.com/files/07-Rusic%20B.%20et%20al.%20MD-Medical%20Data%202012\\_4\(4\).pdf](http://www.md-medicaldata.com/files/07-Rusic%20B.%20et%20al.%20MD-Medical%20Data%202012_4(4).pdf) ( 25.05.2014. )



## 8. SAŽETCI

### 8.1. Sažetak

**Uvod** - Epilepsija je bolest koju karakterizira pojava spontanih napadaja različitih oblika, a nastaju zbog epizoda električnog izbijanja neurona. Suvremeni antiepileptici učinkoviti su u kontroli napadaja, ali nuspojave ograničavaju njihovu upotrebu. Budući da bolesnici te lijekove troše redovito tijekom više godina, važno je da imaju što manje nuspojave. Lamotrigin je lijek koji spada u „novije“ antiepileptike i svakako je postao jedan od lijekova bez kojih je danas nemoguće zamisliti liječenje epilepsije. Danas se redovito, rutinski određuju koncentracije lamotrigina u serumu da se provjeri je li pacijent uzima redovito terapiju ili u slučaju kada se vrši promjena doziranja lijeka.

**Cilj** – Prikazati prednosti primjene HPLC- metode, tekućinske kromatografije s UV- detektorom kod kvantitativnog određivanja koncentracije lamotrigina u pacijenata na svakodnevnoj terapiji ovim lijekom.

**Metode** – Tekućinska kromatografija s UV detektorom, HPLC-UV najčešće je primjenjivana metoda za određivanje koncentracije antiepileptika novije generacije, lamotrigina. Uzorci su pripremljeni ekstrakcijom na čvrstim nosačima, SPE u alkalnoj sredini uz dodatak natrijeve lužine, te zatim podvrgnuti analizi na HPLC instrumentu. Lamotrigin je detektiran na valnoj duljini od 306 nm i pri protoku od 2 mL/min.

**Rezultati** – U radu su analizirani uzorci seruma pacijenata koji su sadržavali određenu količinu lamotrigina. Uzorci su propušteni kroz kolonu pri protoku od 2 mL/min i pri valnoj duljini od 306 nm. Upravo su visokom valnom duljinom izbjegnute interferencije koje potječu iz uzorka. Pri pH od 6,9 dobiven je najbolji kromatografski odgovor.

**Zaključak** – Nakon provedene analize može se zaključiti da je HPLC-UV metoda dovoljno osjetljiva i precizna za određivanje koncentracije lamotrigina u serumu pacijenata. Prednost metode je u bržoj predanalitičkoj pripremi uzorka i kratkom vremenu trajanja analize s pouzdanim rezultatima što je posebno važno kod hitnih slučajeva.

**Ključne riječi:** epilepsija, lamotrigin, uzorci seruma, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).

## 8.2. Abstract

**Introduction** - Epilepsy is a disease characterized by the occurrence of spontaneous seizures of various shapes, and these seizures are due to an outbreak of neuronal electrical episodes. Modern antiepileptics are effective in controlling the seizures, but their using is limited by side effects. Because patients consume these drugs regularly over years, it's important to have as few side effects. Lamotrigine is a drug that belongs to the "newer" antiepileptics which certainly has become one of the important drugs and the treatment of epilepsy it's impossible without it today. Today, the serum concentrations of lamotrigine are routinely determined to check if the patient takes a regular treatment or when the dose of the drug is changed.

**Aim** – To show the advantages of using HPLC method, liquid chromatography with UV detection at a quantitative determination of the concentration of lamotrigine in patients on daily treatment with this medicine.

**Methods** - Liquid chromatography with UV detection, HPLC-UV is the most commonly used method for determining the concentration of the new generation of antiepileptic drugs, lamotrigine. Samples were prepared by extraction of the solid carriers, SPE in alkaline solution with the addition of sodium hydroxide solution and then injected to HPLC analysis instrument. Lamotrigine was detected at a wavelength of 306 nm and a flow rate of 2 mL / min.

**Results** – In this study, samples of patients that contained a certain amount of lamotrigine, are being analyzed. The samples were passed through the column at a flow rate of 2mL/min and at a wavelength of 306 nm. It was the high wavelength avoided interference which may be present in the sample. We obtained the best chromatography response at pH of 6.9.

**Conclusion** – Following the analysis it can be concluded that the HPLC-UV method is sufficiently sensitive and accurate for the determination of serum concentrations of lamotrigine in patients. The advantage of this method is quicker sample preparation and short time duration of analysis with reliable results which is especially important in emergencies.

**Key words:** epilepsy, lamotrigine, serum samples, high performance liquid chromatography (HPLC).

## 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci

IME I PREZIME: Ivana Punda

ADRESA: Šibenska 29, 21 000 Split

DATUM ROĐENJA: 13.11.1992.

DRŽAVLJANSTVO: Hrvatsko

BRAČNI STATUS: neudana

E-MAIL: punda.ivana@gmail.com

### Obrazovanje

2011. – pri Sveučilišnom odjelu zdravstvenih studija upisala sam preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike

2007. - 2011. – Zdravstvena škola Split, smjer farmaceutski tehničar

1999. – 2007. – Osnovna škola Kman- Kocunar, Split

### Dodatno obrazovanje i vještine

- Završen tečaj engleskog i talijanskog jezika u trajanju od 2006. – 2010. U privatnoj jezičnoj gimnaziji „Pitagora“
- Praksa u ljetnim mjesecima tijekom sve tri godine studiranja u Centralnim laboratorijima KBC-a Split.
- Praksa kroz mjesec srpanj i kolovoz 2010. godine u Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije.