

Univerzita Karlova

Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



Využitie kvapalinovej chromatografie vo farmaceutickej analýze II

Diplomová práca

Samuel Sovič

Vedúci práce: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

V Hradci Králové 2023

Čestné prehlásenie

„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, dňa

.....

Samuel Sovič

Pod'akovanie

Rád by som sa pod'akoval vedúcej diplomovej práce PharmDr. Pavle Pilařové, PhD. za ochotu, nápomocnosť a odborné rady a za jej čas počas vypracovania práce. Taktiež by som sa chcel pod'akovať PharmDr. Petrovi Kastnerovi, PhD. za jeho pomoc a cenné rady.

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	Ciele práce.....	11
3	Teoretická časť.....	12
3.1	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.....	12
3.1.1	Princíp HPLC.....	12
3.1.2	Inštrumentácia chromatografov.....	13
3.1.3	Detekčné systémy používané so systémami HPLC.....	14
3.1.4	Chromatografické systémy a fázy.....	18
3.1.5	Testované kolóny.....	22
3.2	Vyhodnotenie dát a metód kvantifikácie analytov.....	23
3.2.1	Kvalitatívna analýza.....	23
3.2.2	Kvantitatívna analýza.....	24
3.3	Validácia.....	26
3.3.1	Presnosť (accuracy).....	27
3.3.2	Precíznosť (precision).....	27
3.3.3	Linearita.....	28
3.3.4	Limit detekcie (LOD) a Limit kvantifikácie (LOQ).....	28
3.3.5	Robustnosť.....	28
3.3.6	Selektivita.....	28
3.4	Vybrané antiepileptiká.....	29
3.4.1	Levetiracetam.....	29
3.4.2	Lamotrigin.....	31
3.4.3	Primidon.....	33
3.4.4	Gabapentin.....	34
3.5	Spracovanie biologického materiálu.....	35
3.5.1	Deproteinácia.....	35
3.5.2	Liquid-liquid extrakcia.....	36
3.5.3	Solid phase extrakcia.....	36
4	Experimentálna časť.....	37
4.1	Technika a použité chemikálie.....	37
4.1.1	Prístrojová technika.....	37
4.1.2	Zoznam použitých chemikálií.....	37
4.2	Postupy a podmienky stanovení.....	38
4.2.1	Príprava roztokov analytov a mobilných fází.....	38

4.2.2	Chromatografické podmienky a proces ich optimalizácie.....	41
5	Výsledky a diskusia	42
5.1.1	Retenčné chovanie analytov	42
5.1.2	Tvorba gradientu pre analýzu vybraných antiepileptik.....	42
5.1.3	Validácia metódy	48
5.1.4	Precíznosť.....	52
5.1.5	Presnosť.....	52
5.1.6	Selektivita.....	57
5.1.7	Analýza reálnych vzoriek	58
6	Záver.....	60
7	Zoznam citovanej literatúry a ďalších zdrojov.....	61

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Samuel Sovič

Školiteľ: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Využitie kvapalinovej chromatografie vo farmaceutickej analýze II

Diplomová práca sa zaoberá analýzou retenčného chovania vybraných antiepileptík: Gabapentin, Levetiracetam, Primidon a Lamotrigin. Boli testované tri rôzne C₁₈ stacionárne fázy Phenyl ; PFP; Kinetex, rôzne zloženie mobilnej fázy, teplota na kolóne a vhodné vlnové dĺžky v rozmedzí 210-220 nm pre všetky analyty. Optimálne podmienky analýzy boli na kolóne Agilent Eclipse XDB-Phenyl 5 μm (4,6mm x 150mm), pri teplote 40 °C a prietoku MF 0,8 ml/min, pri vlnovej dĺžke 220 nm. Vytvorením gradientu bola analýza skrátená z 15 minút pri izokratycznej elúcii na 9 minút. Metóda bola čiastočne validovaná z hľadiska linearity, presnosti, precíznosti, selektivity a robustnosti. Ďalej bola metóda aplikovaná na reálne vzorky pacientov z FN HK.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Samuel Sovič

Tutor: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Title of Thesis: The use of liquid chromatography in pharmaceutical analysis II

The diploma thesis deals with the analysis of the retention behavior of selected antiepileptics: Gabapentin, Levetiracetam, Primidone and Lamotrigine. Three different C₁₈ stationary phases were tested such as Phenyl; PFP; Kinetex, different mobile phase composition, column temperature and suitable wavelengths in the range of 210-220 nm for all analytes. The optimal analysis conditions were on an Agilent Eclipse XDB-Phenyl 5 μm column (4.6 mm x 150 mm), at a temperature of 40 °C and a flow rate of MP at 0.8 ml/min, at a wavelength of 220 nm. By creating a gradient, the analysis was shortened from 15 minutes with isocratic elution to 9 minutes. The method was partially validated in terms of linearity, accuracy, precision, selectivity and robustness. After that, the method was applied for real samples of patients from FN HK.

Zoznam použitých skratiek

A – Area under the peak

ACN – acetonitril

AED – Antiepileptic drug

apod. – a podobne

atď. – a tak ďalej

CNLSL - Condensation nucleation light scattering detector, detektor rozptylu svetla s kondenzačnou nukleáciou

DAD – Diode array detector, detektor s diodovým poľom

ELSD - Evaporative light-scattering detector, detektor odparovacieho rozptylu svetla

EMA – European Medicines Agency, Európska lieková agentúra

ETH – Ethanol

FDA – Food and Drug Administration, Úrad pre kontrolu potravín a liečiv

FN HK – Fakultní nemocnice v Hradci Králové

GABA – Gabapentin

GC – Gas chromatography, plynová chromatografia

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

chrom. - chromatografický

ICH – International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, Medzinárodná rada pre harmonizáciu technických požiadavkov na humánne liečivá

LAMO – Lamotrigin

LC-MS – Liquid chromatography–mass spectrometry, kvapalinová chromatografia s hmotnostnou chromatografiou

LEVE – Levetiracetam

LOD – limit of detection, limit detekcie

LOQ – limit of quantification, limit kvantifikácie

MF – Mobilná fáza

METH – Methanol

MP – Mobile phase

MÚ – Mechanizmus účinku

NPC – Normal Phase Chromatography

napr. – napríklad

PDA – Photodiode array detector, fotodiódový detektor

PRIM - Primidon

RPC - Reverse Phase Chromatography, vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na reverzných fázach

SF – Stacionárna fáza

SLT – Sulfathiazol

TDM – Therapeutic drug monitoring

THF - Tetrahydrofuran

t_R – retenčný čas

tzn. – to znamená

UV - Ultraviolet, ultrafialové žiarenie

UV/VIS – ultraviolet/visible, ultrafialové a viditeľná oblasť svetla

1 ÚVOD

Táto diplomová práca sa zameriava na hodnotenie antiepileptických liečiv ako sú Levetiracetam, Lamotrigin, Primidon a Gabapentin, ktoré sa predovšetkým používajú k liečbe epilepsie. Epilepsia, je porucha pretrvávajúcich nevyprovokovaných záchvatov, ktorá môže byť spojená s kognitívnymi a psychiatrickými problémami. Odhaduje sa, že okolo 70 miliónov ľudí trpí touto poruchou, ktorá znižuje kvalitu života a zvyšuje riziko predčasného úmrtia. Výber antiepileptika (AED), ktoré by kontrolovalo alebo znížilo frekvenciu záchvatov je vysoko individuálne pre každého pacienta, keďže pri správnom výbere liečiva záleží do viacerých faktorov ako je typ záchvatov, vek pacienta a celkové zdravie. Kľúčovým krokom pri začatí liečby je identifikácia záchvatov. Delia sa na fokálne (zahŕňajú lokalizovanú sieť neurónov) alebo generalizované záchvaty (rýchle zapojenie bilaterálne distribuovanej neurónovej siete). Záchvat môže nastať v ktoromkoľvek laloku mozgu, ale najbežnejším je temporálny lalok. Zriedka kedy pri terapii postačí jedno liečivo, je potrebné ich kombinovať. Včasná odpoveď na liečbu je dôležitým pozitívnym prediktorom dlhodobej prognózy, zatiaľ čo vysoký počet záchvatov v čase diagnózy alebo mentálne postihnutie sú prediktormi negatívnymi. Väčšina AED majú úzky terapeutický index. Preto je klinická farmakokinetika a terapeutické monitorovanie liečiv na mieste. (1–4)

Najčastejšou metódou pre TDM je predovšetkým použitie HPLC, ktorá je využívaná pre stanovenie vybraných antiepileptík aj v tejto diplomovej práci. Okrem spomínanej HPLC sa využívajú aj stanovenia pomocou imunochémie alebo plynovej chromatografie (GC). Pre HPLC sa využíva spojenie s UV alebo MS detekciou, prvá zmienaná bola využitá v meraní analytov. Najvhodnejšou stacionárnou fázou je systém reverzných fáz, ktoré sú v súčasnej farmaceutickej analýze najpoužívanejšie, kvôli svojim viacerým benefítom, v tejto diplomovej práci boli využívané tieto reverzné fázy: Phenyl ; PFP; Kinetex.

2 Ciele práce

Diplomová práca nadväzuje na poznatky bakalárskej práce Martina Smolíka (2021), ktorá sa zaoberala retenčným chovaním vybraných antiepileptík – Levetiracetam, Lamotrigin, Gabapentin a Primidon, z čoho sa najmä sústredila na prvé dve zmienené liečivá. Cieľom tejto diplomovej práce je overenie vyvinutej metódy na iných stacionárnych fázach t.j. Phenyl a PFP, pri rôznych podmienkach (zmena prietoku, zmena teploty, zmena zloženia pufru a zmena koncentrácie pufru) a taktiež prevedenie čiastočnej validácie metódy ako je linearita, precíznosť, presnosť, robustnosť, aby mohla byť metóda použitá ako záložná k HPLC-MS vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové.

Posledným cieľom je overenie metódy na reálnych vzorkách dostupných z FN v HK.

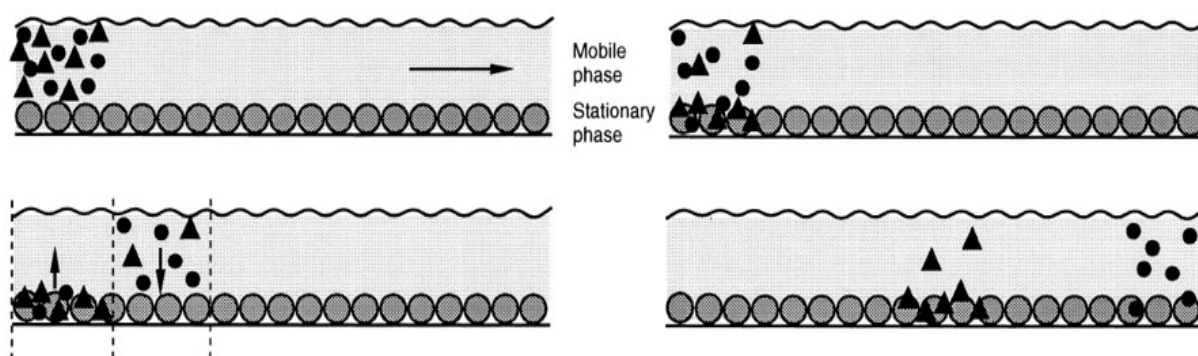
3 Teoretická časť

3.1 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (High Performance Liquid Chromatography - HPLC), je univerzálna analytická metóda, používaná na separáciu, identifikáciu a kvantifikáciu komponentov zmesi. HPLC môže byť plne automatizovaná pomocou sofistikovaných autosamplerov a systémov na získavanie dát pre nepretržitú analýzu a generovanie výsledkov. Je vhodná pre analýzu širokého množstva existujúcich zlúčenín, aj tých, ktoré sú tepelne nestále, alebo náchylné k oxidácii. Medzi jej výhody patrí rýchlosť (väčšina analýz trvá do 30 minút), široký výber stacionárnych fáz, senzitivita (rôzne detektory). (5, 6)

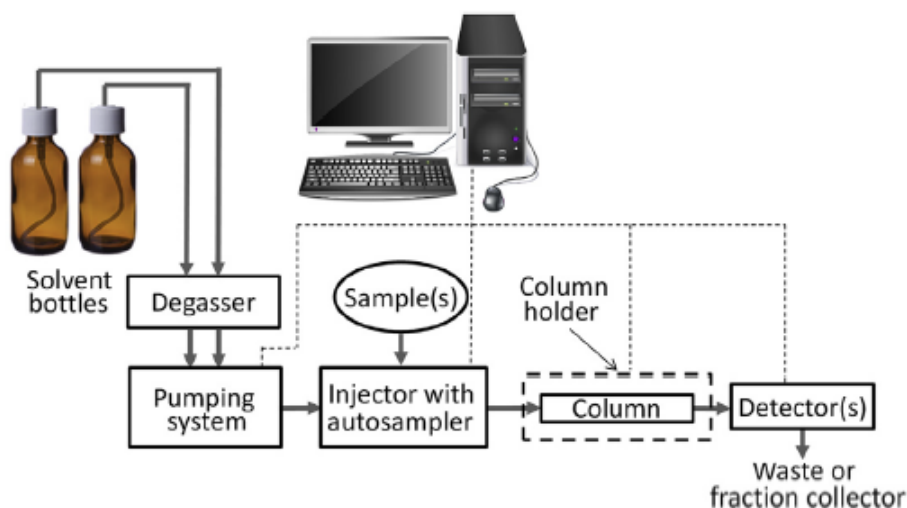
3.1.1 Princíp HPLC

HPLC funguje na princípe separácie medzi dvoma fázami – stacionárnou fázou (SF) a mobilnou fázou (MF). Analýza začína vstreknutím rozpustenej vzorky v rozpúšťadle do kvapalnej mobilnej fázy, ktorá je pod vysokým tlakom pumpovaná do kolóny. Kolóna je naplnená stacionárnou fázou, ktorá interaguje s prúdiacou mobilnou fázou. Zložky, ktoré majú silnejšiu afinitu k stacionárnej fáze, budú dlhšie zadržané a budú sa eluovať neskôr, zatiaľ čo zložky, ktoré majú slabšiu afinitu k stacionárnej fáze, opustia kolónu rýchlejšie. Táto rozdielna retencia spôsobí, že sa jednotlivé zložky zmesi oddelia pri prechode kolónou. (7–9)



Obrázok č.1: Zobrazenie separácie. (9)

3.1.2 Inštrumentácia chromatografov



Obrázok č.2: Schématické znázornenie HPLC systému. (8)

HPLC systém pozostáva z nasledujúcich komponentov: zásobníky s mobilnou fázou, vysokotlakové čerpadlo (pumpa), degasser (odplynovač), dávkovač (autosampler), kolóna, detektor, počítač so softvérom a odpadová nádoba. Úlohou zásobných fliaš je poskytnutie dostatočného množstva objemu mobilnej fáze na HPLC separáciu. MF sa za pomoci čerpadla, ktoré zaisťuje kontrolovaný a stály prietok, dostáva pod vysokým tlakom do systému. Pumpy obsahujú pohyblivé časti ako ventily a piesty, ktoré sú náchylné na poškodenie malými časticami ako je prach, odporúča sa sfiltrovať MF za pomoci aspoň 0,45 μm alebo 0,22 μm filtru pred uvedením do HPLC systému. Degasser slúži na odplynenie mobilnej fáze. Ak sa neodstráni plyn z MF, môžu nastať komplikácie ako fluktuácia tlaku, ovplyvnenie analýzy pri nízkych objemoch analytu (1-2 μL) a podobne. Dávkovač vstrekuje analyt v určitom objeme (v jednotkách μL) z vialky alebo insertu do toku mobilnej fázy. Medzi autosamplerom a kolónou resp. tesne pred kolónou sa môže nachádzať kratšia predkolóna, ktorá slúži ako ochrana analytické kolón pred zanesením napr. zbytkovým balastom z biologického vzorku. MF aj s analytom vstupuje do kolóny, ktorá je vyhrievaná na určitú teplotu v termostate, odohráva sa v nej separácia zložiek. Za kolónou sa nachádza detektor, v ktorom dochádza k detekcii analytu. Zbytok MF pokračuje do odpadovej nádoby. Počítač má analytický systém, ktorý riadi analýzu a vyhodnotenie výsledkov. Záznam analýzy je zobrazený v podobe chromatogramu. (8, 10, 11)

3.1.3 Detekčné systémy používané so systémami HPLC

Chromatografický detektor je komponent meniaci chemickú alebo fyzikálnu povahu eluovaného analytu na merateľný signál zodpovedajúci jeho identite alebo koncentrácii. Ideálny detektor by mal mať nasledujúce vlastnosti : vysoká citlivosť, predvídateľná odozva, reaguje na všetky rozpustené analyty, reaguje nezávisle od mobilnej fázy apod. Takýto detektor neexistuje, miesto toho existujú detektory, fungujúce na 4 základných detekčných technikách.

- 1) Objemová vlastnosť (tzv. bulk property) – najuniverzálnejšie detektory pre HPLC, merajú spoločné vlastnosti pre všetky analyty meraním rozdielov v mobilnej fáze so vzorkou a bez neho. Najbežnejší detektor je detektor indexu lomu. Vzhľadom na univerzálne vlastnosti týchto detektorov sa kladie väčší dôraz na výber chromatografickej kolóny.
- 2) Analyt špecifické vlastnosti, reagujú na unikátne vlastnosti meraného analytu. UV-detektor je toho príkladom, keďže absorbuje žiarenie pri určitej vlnovej dĺžke, sú špecifické a reagujú na zlúčeniny obsahujúce chromoforické skupiny (amido-, nitro- atď.). Do tejto skupiny patria aj detektory založené na fluorescencii, konduktivitě alebo elektrochémii.
- 3) Modifikácia mobilnej fázy, tieto detektory menia MF v post-kolóne na vyvolanie zmeny vlastností analytu, napr. vytváranie častíc suspendovaných v plynnej fáze.
- 4) Spojené techniky, jedná sa o zakomponovanie samostatnej analytickej časti do HPLC systému ako je napr. spojenie hmotnostnej spektrometrie LC-MS s HPLC. (9, 12)

3.1.3.1 UV-VIS detektory

Najpoužívanejšie typy detektorov sú fotometre založené na absorpcii ultrafialového a viditeľného svetla. Tento typ detektoru bol používaný na detekciu v tejto diplomovej práci. Väčšina analyzovaných zlúčenín má spektrum absorpcie vo viditeľnom svetle v rozmedzí (190-600 nm), monitorujú absorpciu UV alebo viditeľného svetla v HPLC eluente, meraním energetického pomeru lúča vzorky voči referenčnému lúču. Princípom je Lambert-Beerov zákon, kde absorbancia je vyjadrená ako negatívny logaritmus transmitancie. Absorbancia závisí od koncentrácie tzn. aby sa dosiahli nízke detekčné limity, musí byť chromatografický pás, čo najviac koncentrovaný aby sa dosiahla vysoká výška píku. (10)

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon \cdot b \cdot c$$

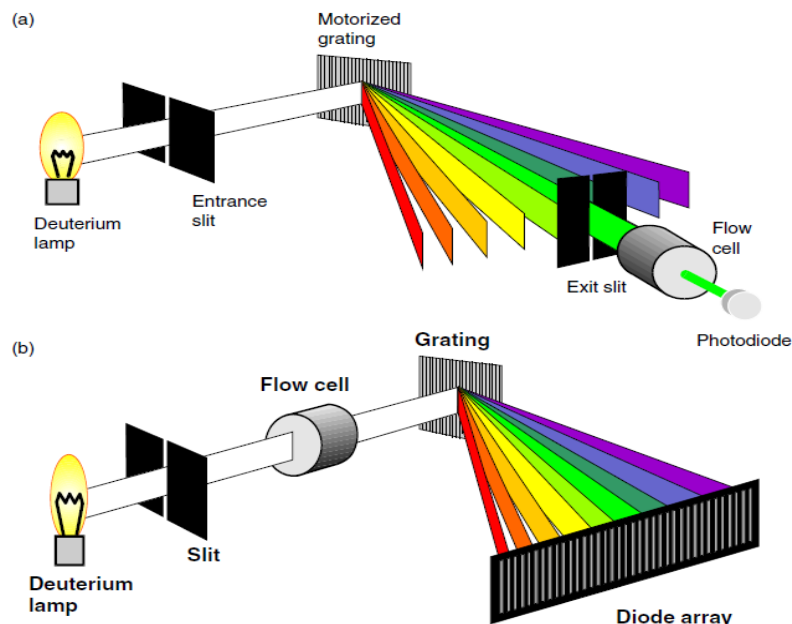
I_0 – intenzita dopadajúceho svetla I – intenzita prechádzajúceho svetla

ε – molárny absorbný koeficient b – dĺžka absorbujúcej vrstvy c - koncentrácia analytu

UV-VIS detektor sa skladá z deutériovej lampy, monochromátoru (mriežka, ktorou sa dá určiť špecifická vlnová dĺžka) a malej prietokovej cely. Vlastnosti mobilnej fázy dokážu ovplyvniť analýzu. (12)

UV-VIS detektory sa podľa ich konštrukcie rozdeľujú na nasledujúce typy :

1. *Detektor s fixnou vlnovou dĺžkou* – najstarší a v súčasnosti najmenej používaný. Zdrojom žiarenia je nízkotlaková ortuťová lampa, ktorá detekuje pri 254 nm.
2. *Detektor s variabilnou vlnovou dĺžkou* – môže byť nastavený na maximálnu absorbanciu analytu alebo na vlnovej dĺžke, ktorá poskytuje väčšiu selektivitu. Vlnová dĺžka sa môže počas vývoja chromatogramu meniť, ak sú analyty detekované pri rozdielnej vlnovej dĺžke. Tungstenova lampa sa používa pri viditeľnom svetle (200-400 nm) a deutériová lampa sa používa pri 200-600 nm.
3. *Detektor diódového poľa (DAD), fotodiódového poľa (PDA)* – názov vychádza z usporiadania fotodiód, ktoré spracujú prijatý signál a vygenerujú spektrum analytu za krátky čas. Vďaka tomu sa dokáže identifikovať peak, taktiež je možné spektrálne rozlíšiť dva blízko eluované peaky. (11–13)



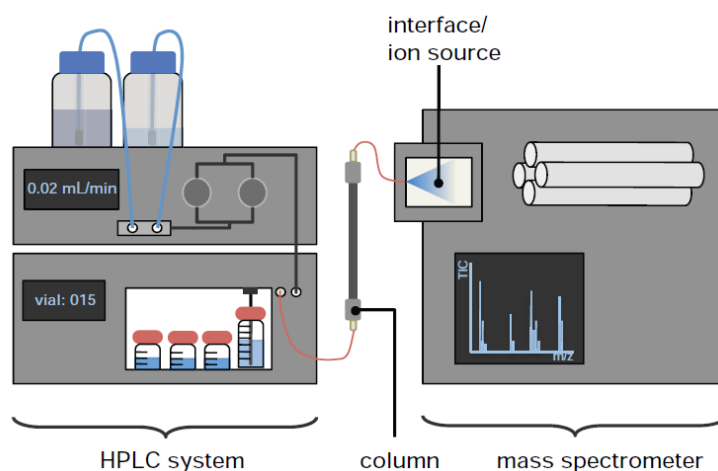
Obrázok č.3: Schématické znázornenie detektorov a) UV-VIS b) PDA. (14)

Porovnanie UV-VIS nastaviteľného detektora a PDA. V prípade variabilného UV-VIS, svetlo prechádza cez monochromátor a potom cez prietokovú celu. PDA, má prietokovú celu pred mriežkou, ktorá rozptýli svetlo na pole fotodiód.

UV-VIS detektory sú ideálne pre gradientovú elúciu, sú jednoduché na obsluhu, majú vysokú citlivosť pre vzorky, ktoré absorbujú UV žiarenie, majú dobrý lineárny rozsah, taktiež sú relatívne neovplyviteľné prietokom MF a zmenou teploty. (11)

3.1.3.2 Hmotnostná spektrometria

Detektory hmotnostnej spektrometrie sú najvýkonnejšie a najuniverzálnejšie, kombinujú HPLC s MS a poskytujú informácie o identite a množstve chemických zlúčenín vo vzorke. Najčastejšie sa používajú pri analýze biologických vzoriek. Pri tejto kombinácii sa separované zlúčeniny eluujúce z HPLC kolóny ionizujú pomocou napr. elektrospreju v MS zdroji a následne sa separujú na základe ich hmotnostno-nábojového pomeru (m/z). Výhodami sú ich vysoká citlivosť (LC-MS dokáže detekovať zlúčeniny vo veľmi nízkych koncentráciách), selektivita a všestrannosť. Na druhú stranu sa jedná o najdrahšie detektory a vyžadujú špecializované školenie a znalosti na ich používanie. (6, 8)



Obrázok č.4: HPLC systém spojený s MS. (10)

3.1.3.3 Ostatné typy detektorov

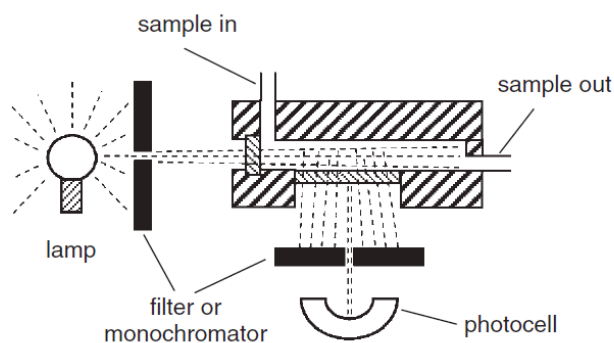
Refraktometrický detektor

RI (refrakčný index) detektor je univerzálny detektor, meria optický rozdiel RI medzi mobilnou fázou a analytom, je veľmi citlivý pre analyty, ktoré majú rozdielny index lomu ako mobilná fáza. RI je fyzikálny parameter, ktorý definuje rýchlosť svetla v médiu. Tieto detektory sú

citlivé na zmeny prietoku mobilnej fáze, tlaku alebo teploty. Refrakčný index mobilnej fáze musí byť konštantný, pre to je tento typ detekcie nevhodný pre gradientovú elúciu. (10–12)

Fluorescenčné detektory

Fluorescenčné detektory sú veľmi citlivé a selektívne HPLC detektory, ktoré merajú fluorescenciu emitovanú analytom po excitácii svetlom konkrétnej vlnovej dĺžky. Ideálne pre veľmi citlivé a selektívne analýzy fluorescenčných zlúčenín. Fluorescencia nastáva, keď zlúčenina absorbuje radiáciu a potom ju vyžiari pri dlhšej vlnovej dĺžke. (15)



Obrázok č.5: Fluorescenčný detektor. (11)

Elektrochemické detektory

Elektrochemické detektory sa považujú za najviac citlivé a špecifické detektory používané v HPLC analýze. Detekujú iba tie analyty, ktoré sú buď oxidované alebo redukované elektrickým prúdom, v izokratickej mobilnej fáze, tá musí viesť prúd, ktorý je úmerný koncentrácii zlúčeniny. EC detektory sa delia na ampérometrické – merajú zmenu prúdu a coulometrické – merajú náboj, potrebný na oxidáciu alebo redukciu. (7, 16, 17)

Detektory rozptylu svetla

Jedná sa o skupinu detektorov, ktoré sú univerzálne a nezávislé od vlastností analytu (absorpčné, fluorescenčné a elektrochemické vlastnosti). Podmienkou je aby bol daný analyt menej volatilný ako ostatné komponenty mobilnej fázy. Fungujú na princípe nebulizácie teda zmlženi MF na aerosol, ktorý je vo forme kvapôčok detekovaný rôznym druhom svetla. Evaporative light-scattering detector (ELSD), meria rozptyl svetla, ktoré je priamo úmerné molekulovej hmotnosti analytu.

Do tejto skupiny patrí aj CNLSD (Condensation nucleation light scattering detector), vhodný pre látky, ktoré obsahujú dusík ako napr. aminokyseliny. (10, 12, 17)

Vodivostné detektory

Vodivostné detektory merajú vodivosť mobilnej fáze resp. impedanciu medzi dvoma elektródami v prietokovej cele. Používajú sa pri iontovej chromatografii alebo iontovo výmennej separácii, kedy analyt neobsahuje UV chromofór. (12)

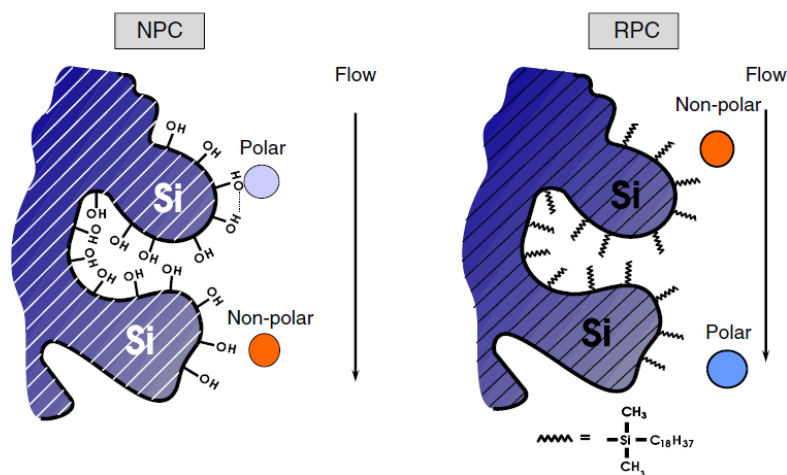
3.1.4 Chromatografické systémy a fázy

3.1.4.1 Separáčné módy

V HPLC analýze existuje široká škála mobilných fáz, kolón a možností obmeny, ktoré umožňujú výber ideálneho postupu. K získaniu optimálneho výsledku je možno použiť niekoľko typov separačných módov. (15)

Normal-Phase Chromatography (NPC), je separačný mód založený na rozdieloch polarít medzi stacionárnou fázou a mobilnou fázou. V NPC je stacionárnou fázou polárna látka ako napríklad silikagel alebo celulóza, zatiaľ čo mobilnou fázou je nepolárne rozpúšťadlo ako napríklad hexán, heptán alebo chloroform. Polárna SF interaguje s polárnymi molekulami MF, čo im umožňuje zostať na kolóne dlhšie ako nepolárne látky, ktoré sú eluované medzi prvými. Čas zadržania zlúčeniny v NPC ovplyvňuje jej polarita a veľkosť. Tento mód sa používa často na separáciu mastných kyselín alebo steroidov. Nevýhodou je nízka opakovateľnosť, kvôli variabilite stacionárnej fázy a taktiež je obtiažne kontrolovať retečný čas analytov. (6, 14, 15)

Reversed-Phase Chromatography (RPC), sa využíva najčastejšie vo farmaceutickej analýze, je založená na rozdeľovacom koeficiente medzi polárnou mobilnou fázou (napr. zmes vody a acetonitrilu) a nepolárnou SF), kde na kremíkovom základe sú kovalentne naviazané hydrofóbne skupiny ako oktadecyl (C_{18}). Polárne analyty sa elujú skôr ako hydrofóbne analyty, ktoré majú silnejšie interakcie s hydrofóbnou C_{18} skupinou, ktorá vytvára liquid-like vrstvu okolo pevnej kremíkovej vrstvy, táto postupnosť je opačná voči NPC. Retenčný čas látky je ovplyvnený jej hydrofóbnosťou, veľkosťou a stupňom ionizácie. RPC je reprodukovateľný, poskytuje dobrú separáciu a vysoké rozlíšenie analytov s podobnou štruktúrou a hydrofobitou. Tento mód je vhodný pre analýzu drog, metabolitov a peptidov. (6, 14, 15)



Obrázok č.6: Porovnanie NPC a RPC (znázornenie prietoku). (14)

Ion-Exchange Chromatography (IEC), je považovaná za špeciálny typ adsorpčnej chromatografie, funguje na výmene iontových analytov s protiiontami, ktoré sú naviazané na pevný základ. Ako stacionárne fázy sa používajú kationické vymieňače (sulfonát) alebo anionické vymieňače (kvartérne amíny), sú viazané na polymérne alebo kremíkové materiály. Mobilná fáza obsahuje pufrý so zvýšenou iontovou silou (vyššia koncentrácia NaCl) aby bola dosiahnutá migrácia analytov. Tento mód je používaný pri iónoch a biologických látkach napr. aminokyseliny, proteíny a peptidy, polynukleotidy. (14, 15)

Size-Exclusion Chromatography (SEC), je separačný mód založený na molekulovej veľkosti analytu. Stacionárna fáza v prípade SEC pozostáva z náplne kolóny, ktorej póry majú rozmery porovnateľné s molekulami, ktoré budú frakcionované, takže príliš veľké častice budú eluované ako prvé a menšie budú prestupovať dovnútra. Náplne sa delia do dvoch skupín. Semirígidna s hydrofóbnym médiom, používaná s organickou MF na separáciu polymérov a mäkká s hydrofilným géloom, tvorené z cross-linked dextranu. Výhodou SEC je, že môže oddeliť molekuly bez zmeny ich chemických vlastností alebo poškodenia ich štruktúr. Avšak nemusí poskytnúť vysoko rozlíšenú separáciu. (14, 18)

HILIC, Hydrophilic interaction chromatography, má podobné vlastnosti ako NPC, používa polárnu SF ako je silikagel, ale MF je polárna tvorená organickými rozpúšťadlami alebo puframi. Využíva sa na separáciu polárnych analytov, iónov, hydrofilných peptidov apod. (14, 19)

3.1.4.2 Mobilná fáza

Mobilná fáza je rozpúšťadlo, kt. prenesie analyt cez celý systém až do kolóny. MF je vybraná podľa jej chromatografických vlastností, musí interagovať s adekvátnou SF, tak aby bola zaručená rýchla a efektívna separácia. Medzi vlastnosti podľa ktorých sa riadi výber patria : viskozita (nižšia viskozita zabezpečuje rýchlejšiu analýzu), toxicita, čistota, bod varu, inertnosť (MF nesmie reagovať s analytmi), nekorozívna pre HPLC komponenty a cena. Najčastejšie užívané MF sú ACN, THF, ETH a voda. Pri RPC sú kvôli zloženiu MF (voda a ACN, ETH) potrebné pufrý, ktoré udržiavajú určité hodnoty pH. Koncentrácia mobilnej fázy môže byť konštantná pri izokratckej elúcii alebo sa jej množstvo môže meniť podľa prednastaveného gradientu. (9, 14)

Počas izokratckej analýzy je pumpované rovnaké množstvo MF, medzi jej nevýhody patria limitovaná kapacita pík, ak sú analyty opačnej polaroty a neskoro eluujúce látky (dlhý retenčný čas). Využitie gradientu je vhodnejšie pri komplexných zlúčeninách, ktoré potrebujú kvantifikáciu alebo pri analýze väčšieho množstva analytov s rozdielnou polaritou. Píky majú podobnú šírku počas celej analýzy, vyššiu kapacitu a lepšiu senzitivitu pre neskôr eluujúce peaky atď. (14, 20)

3.1.4.3 Stacionárna fáza

Analytické HPLC kolóny, sú podlhovasté trubice, tvorené z ocele o dĺžke 10-25 cm, s vnútorným priemerom 2-5 mm. Vnútro tvorí stacionárna fáza v ktorej prebieha separácia zložiek vzorky na základe ich retenčných vlastností. Častice, ktoré tvoria SF majú rozmery 1,5-5 μm a mali by byť chemicky (kompatibilita s mobilnou fázou), mechanicky stabilné (odolnosť voči vysokému tlaku) a mať veľký povrch (porozita). Rozmer častíc ovplyvňuje účinnosť separácie. (10, 11, 21)

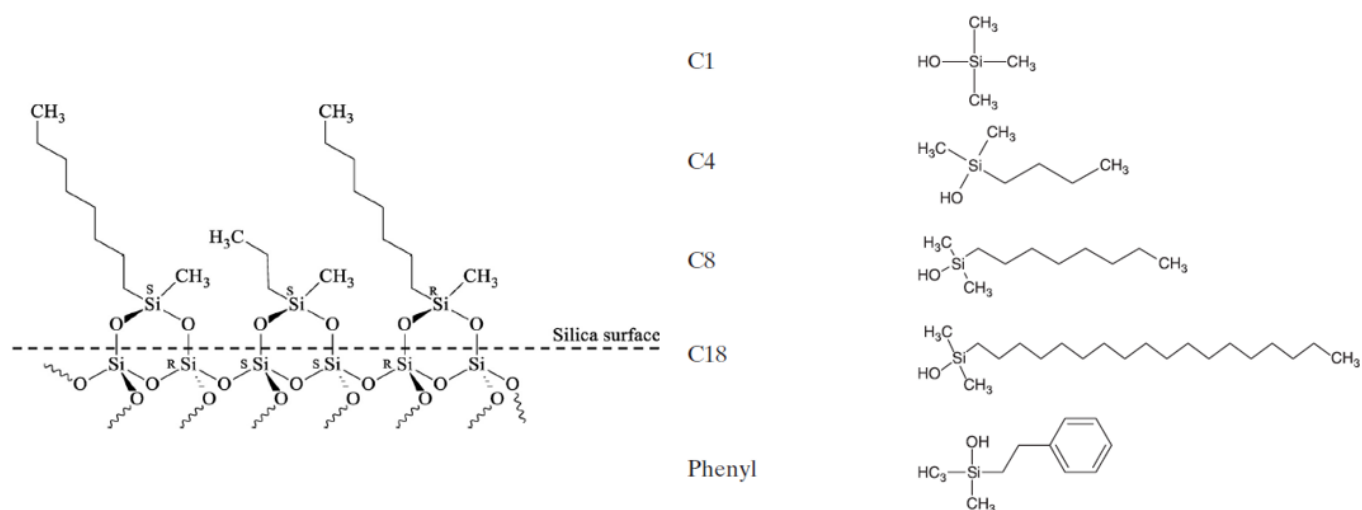
Stacionárna fáza tvorená silikagélom

Silikagél je najpoužívanejším plniacim materiálom v HPLC kolónach. Jedná sa o pórovitý materiál s vysokou povrchovou plochou, ktorá umožňuje efektívnu separáciu širokého spektra zlúčenín. Silikagél sa pripravuje pomocou viacerých metód, jednou z nich je sol-gel príprava, kedy je na začiatku kremičitan sodný alebo alkoxyasilan, z ktorých vznikajú sférické porézne častice rovnomernej veľkosti. Existujú dva typy silikagélu, typ A má nižšiu koncentráciu silanolových skupín zatiaľ čo typ B je plne hydroxylovaný. Silikagél je limitovaný pH

rozsahom, pri $\text{pH} < 2$ sú ligandy hydrolyticky štiepené a pri $\text{pH} > 8$ je silikagél náchylný k rozpusteniu. (10, 14, 21)

Stacionárna fáza tvorená modifikovaným silikagélom

Chemicky modifikovaný silikagel je výplňou reverznofáznej HPLC kolóny, tento typ je najčastejší a najpoužívanejší. Hydrofóbne skupiny ako oktyl C_8 alebo dekaoktyl C_{18} (primárne využívané) sa kovalentne naviažu na hydroxylové skupiny silanolových skupín. Tento krok im zaručí zvýšenú stabilitu a selektivitu, sú použiteľné na polárne aj nepolárne analyty. Alkylové substituenty sú najčastejšie ($\text{C}_4 - \text{C}_{30}$), existujú aj kyano- alebo aminopropyl- modifikácie. Povaha substituentu určuje typ separačného módu, či to bude RPC, NPC alebo IEC. Jednou z výhod SF s modifikovaným silikagélom je ich vysoká stabilita, ktorá im umožňuje použiť širokú škálu mobilných fáz. Taktiež sú pomerne lacné a široko dostupné. (6, 10, 11)



Obrázok č.7: Naviazané alkylové substituenty na silanolové skupiny. (8, 15)

Polymérne výplne

Porézne polymérne častice sa vyrábajú pomocou cross-link polystyrénu, menej časté sú aj metakryláty a polyvinylalkoholy. Hlavnou výhodou polymérnych častíc je ich pH stabilita, hocijaká mobilná fáza je akceptovateľná, rozmedzie pH je od $0 \leq \text{pH} \leq 14$. Polymérne kolóny s naviazanými ionizovanými funkčnými skupinami ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ a NR_3^+) sa používajú hlavne v IEC. Nevýhodou je zmršťovanie častíc, čo spôsobuje zníženú efektivitu separácie. (11, 17)

Grafitové výplne

Grafitový uhlík je použiteľný pre NPC aj RPC, je pH stabilný a znesie vysoké teploty $\leq 200^{\circ}\text{C}$. Zadržiava polárne zlúčeniny vďaka kombinácii silnej hydrofóbnej, elektrónovej a dipolárnej interakcii. Ich využitie je prospešnejšie pri SPE ako pri HPLC separácii. Nevýhodou tohto typu výplne je nepredvídateľná selektivita alebo nižšia kvalita pík, spôsobená horšiu distribúciou pórov. (9–11, 21)

Oxidy kovov

Stacionárne fázy založené na oxidoch kovov ako sú oxid zirkoničitý, titaničitý a hlinitý sú odolné voči zvýšenej teplote, hydrolyticky stabilné a majú široký rozsah pH využitia. Pri týchto materiáloch nie je možné kovalentne naviazať alkyly, za to je možné modifikovať crosslink polymérmi. Najpoužívanejší je oxid zirkoničitý. (11, 17, 20)

3.1.5 Testované kolóny

Kolóna ECLIPSE XDB-Phenyl 5 μm

Kolóna Eclipse XDB-Phenyl 4,6 mm x 250 mm (5 μm). Výplň kolóny je tvorená z hustej monovrstvy dimetylfenylethylsilánovej stacionárnej fázy na pórovitý oxid kremičitý Zorbax Rx-Sil. Táto podporná vrstva slúži na zníženie alebo elimináciu silnej adsorpcie vysoko polárnych a bazických látok. Maximálna odporúčaná teplota je okolo 60 $^{\circ}\text{C}$. Medzi mobilné fázy, ktoré sa najviac hodia ku kolóne patria zmesi acetonitril/voda, metanol/voda. Kolóna má rozsah použitia v rozmedzí pH 2-9 ale na dlhodobé použitie je vhodnejšie rozmedzie pH 3-8. (22)

Kolóna ACE 3 C₁₈ - PFP

Kolóna ACE 3 C₁₈ – PFP 100 x 4,6 mm. Jedná sa o kolónu, ktorej jadro sa skladá z PFP teda PentaFlouroPhenyl spojených fáz. Tento typ sa používa pri separáciách, ktoré zahŕňajú halogenované aromatické zlúčeniny, regioisoméry a iné. Odporúčané rozmedzie pH je 2-8, teplota by nemala presahovať 60 $^{\circ}\text{C}$. (23)

Kolóna Kinetex 5 μ m C₁₈ Phenomenex

Kolóna Kinetex 5 μ m C₁₈ 150 x 4,6 mm, využíva Core-Shell technológiu tzn. nahradenie stredú častíc nepriepustnou časťou ako je sklenená guľička. Tento spôsob úpravy sorbentov zaručuje vyššiu účinnosť separácie a vyššiu citlivosť analýzy. Odporúčané rozmedzie pH je 2-8 a maximálna teplota je do 60°C. (22, 23)

3.2 Vyhodnotenie dát a metód kvantifikácie analytov

HPLC systém sprostredkuje záznam analýzy vo forme chromatogramu, kde sú zaznamenané píky, ktoré by mali mať ideálne tvar Gaussovej krivky. Pri vyhodnotení výsledkov analýzy je za potreby aby HPLC systém dosahoval predvídateľné a opakovateľné výsledky. (8, 11)

3.2.1 Kvalitatívna analýza

Kvalitatívna analýza má za cieľ zistiť totožnosť neznámych komponentov vo vzorke, pomocou rôznych hodnôt, ktoré je možné vyčítať z chromatogramu. Najčastejšie používaná technika pre kvalitatívnu analýzu, je porovnanie retenčného času analytu a t_R referenčného štandardu. Retenčný čas (t_R) je doba medzi nástrekom analytu a jeho zaznamenaním detektorom v maximálnej výške píku, udáva sa v minútach ale aj sekundách pri rýchlej separácii. Jeho posun môže byť spôsobený zmenou prietoku MF, zmenou teploty, pomeru fáz. Retenčný čas je charakteristický ale nie je unikátny tzn. viac ako jedna zlúčenina môže mať rovnaký t_R . V_R je retenčný objem, ktorý sa vypočíta vynásobením retenčného času s rýchlosťou prietoku MF, udáva sa v mL. Mŕtvy retenčný čas t_0 alebo aj t_M je čas nezadržaného komponentu MF, ktorý nesúvisí s analytom. Redukovaný retenčný čas t'_R je rozdiel medzi t_R a t_0 , udáva čas, ktorý analyt strávil na kolóne. (11, 20, 21, 26)

Rozlíšenie (R_s)

Cieľom väčšiny HPLC analýz je separácia rozličných analytov od seba vo vzorku na následné kvantitatívne meranie. Stupeň oddelenia dvoch susedných píkov je známy ako rozlíšenie (R_s), je definované ako rozdiel retenčných časov dvoch píkov delené priemernou šírkou píkov. (14)

Faktor symetrie (A_s)

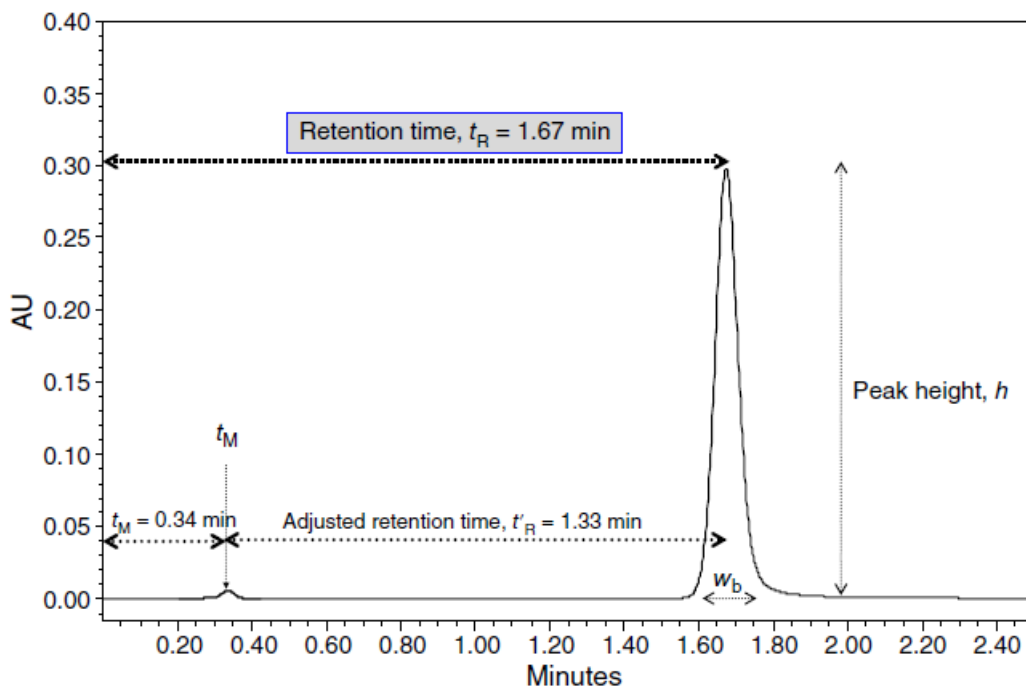
Ideálny chromatografický pík by mal byť symetrický, Gaussova krivka. Odchýlky od ideálneho tvaru píku možno kvantifikovať pomocou faktora symetrie. Ak je hodnota $A_s > 1,0$ jedná sa o chvostovanie píku ak je hodnota $A_s < 1,0$ jedná sa o čelnú symetriu píku. Hodnota $A_s = 1,0$ značí symetriu píku. (26)

Odozva

Schopnosť detektoru poskytnúť presné kvantitatívne dáta závisí od veľkosti signálu analytu, šumu a od driftu. Šum (noise) je definovaný ako výchylky základnej línie (base line) v smere nahor alebo nadol, spôsobený zmenou elektrického signálu alebo kolísaním teploty.

Pomer signálu k šumu (S/N), krátkodobý šum ovplyvňuje presnosť stanovenia zložiek, na kvalitatívne vyhodnotenie analytu je potrebné aby jeho pík bol trojnásobne vyšší ako výška šumu a pri kvantifikačnom vyhodnotení musí byť jeho výška desaťnásobná.

Drift sa zobrazuje ako dlhodobá deviácia základnej línie, môže byť spôsobený gradientovou elúciou, zmenou zloženia MF atď. (8, 9, 14, 26)



Obrázok č.8: Pík zobrazený s retenčným časom t_R , výškou píku (h), šírkou (w_b). (14)

3.2.2 Kvantitatívna analýza

Kvantitatívna analýza, je založená na stanovení vzťahu medzi koncentráciou analytu prechádzajúceho detektorom a jeho odozve za použitia buď plochy pod píkom (A- area under the peak) alebo výšky píku h , ak sú dané píky rovnomerné a ostré.

Metóda vonkajšieho štandardu

Výpočet koncentrácie vzorky vychádza z pomeru plochy pod píkom vzorky a štandardu, ktoré by mali byť priamo úmerné koncentrácii. Referenčný štandard je analyzovaný samostatne od analytu. Nasledujúci vzorec je upravený na výpočet koncentrácie vzorky. (11, 26)

$$C_{vz} = \frac{A_{vz}}{A_{ST}} C_{ST}$$

C_{vz}, C_{ST} – Koncentrácia vzorky a štandardu

A_{vz}, A_{ST} – Plocha pod krivkou vzorky a štandardu

Metóda vnútorného štandardu

Táto metóda je založená na podobnom princípe, rozdiel je v použití IS – interného štandardu, ktorý sa pridá k analyzovanej a referenčnej vzorke v rovnakom množstve. Vnútorný štandard má spĺňať nasledujúce vlastnosti :

1. Neprítomnosť vo vzorke
2. Dostatočná stabilita a čistota
3. Štruktúrna podobnosť analytu s podobnými fyzikálne-chemickými vlastnosťami (pKa, logP)
4. Rozlíšiteľnosť od analytu
5. Podobná retencia ako stanovený analyt (eluuje po analyte)

Interný štandard sa pridáva do vzorky pred analýzou a jeho retenčný čas by mal byť odlišný od t_R analytu. Ak je potrebná zložitejšia úprava vzorky pred HPLC analýzou pri ktorej môže dôjsť ku chybe počas prípravy, je práve táto metóda vhodná. Nasledujúcim vzorcom sa vypočíta koncentrácia vzorku za pomoci vnútorného štandardu. (11, 26)

$$C_{vz} = \frac{\left(\frac{A_{vz}}{A_{IS}}\right)}{\left(\frac{A_{ST}}{A_{IS}}\right)} C_{ST}$$

A_{IS} – plocha vnútorného štandardu

Metóda štandardného prídavku

Metóda, využívaná pri kvantitatívnom stanovení vzoriek, je vhodná u vzoriek, kde je ťažko dostupný blank, z ktorého je potrebné pripraviť referenčný štandard pridaním známeho množstva analytu. Používa sa pri kvantifikačnom stanovení endogenných látok v biologickom materiáli. (11)

Metóda normalizácie

Obsah stanovovanej látky sa vyjadří ako percentuálny podiel z plôch všetkých pík na chromatograme, zanedbajú sa píky náležiacie rozpúšťadlám a pímy pod limitom zanedbateľnosti. Využíva sa pre hodnotenie stability alebo čistoty. (11)

Kalibračný postup

Pri tomto postupe sa pripraví vzorky v definovanej koncentrácii, následne sa zanalyzujú a z nameraných dát sa zostrojí kalibračná krivka, z ktorej sa dá odčítať koncentrácia analytu. Rovnica priamky je $y = ax + b$, z vypočítanej smernice a úseku na osi y je možné vypočítať koncentráciu analytu. (11, 26)

3.3 Validácia

Validácia je proces, ktorý potvrdzuje vhodnosť vyvíjanej metódy pre jej zamýšľané použitie pomocou laboratórnych štúdií. Validácia metódy je kľúčovým krokom pri zabezpečení presnosti, spoľahlivosti a opakovateľnosti výsledkov analýzy. Existujú rôzne regulačné authority, ktoré požadujú aby analytické metódy vo farmaceutickom priemysle boli spoľahlivé, presné a splňali požadované normy. International Conference on Harmonisation (ICH), vydáva obsiahle guideliney, ktoré harmonizujú registračné požiadavky medzi Európskou Úniou, USA a Japonskom. Food and Drug Administration (FDA) vydáva, Guidance for Industry on Analytical Procedures and Methods Validation, ktorý zabezpečuje bezpečnosť a reguláciu liečiv na americkom trhu. EMA (European Medicines Agency) je ústredný regulátor pre EÚ.

(14, 20, 27)

3.3.1 Presnosť (accuracy)

Presnosť je mierou exaktnosti analytickej metódy alebo jej blízkosti k zhode medzi akceptovanou referenčnou hodnotou a hodnotou získanou vo vzorke. Meria sa ako percento analytu získaného pomocou analýzy a stanovuje sa v celom rozsahu metódy. Smernice odporúčajú, aby boli dáta získané z minimálne deviatich meraní na minimálne troch koncentračných úrovniach tj. tri koncentrácie nízka, stredná, najvyššia a od každej tri replikácie. Namerané hodnoty sa vyjadria ako rozdiel medzi priemernou a skutočnou hodnotou s intervalom spoľahlivosti ($\pm 1SD$). Hodnota presnosti sa blíži k 100 %. (11, 14)

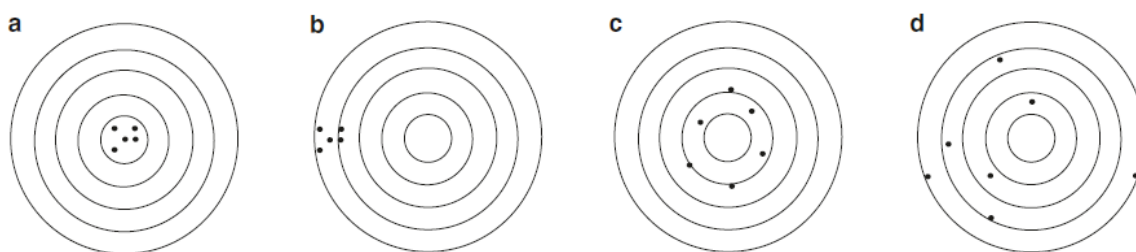
3.3.2 Precíznosť (precision)

Precíznosť, vyjadruje blízkosť zhody medzi sériou meraní získaných z viacnásobného odobratia rovnako homogénnej vzorky za predpísaných podmienok v skúšobnej metóde. Vyjadrená je nasledujúcimi metódami:

Opakovateľnosť (repeatability), je definovaná ako schopnosť metódy generovať podobné výsledky pri viacnásobnej príprave rovnakej vzorky v krátkom časovom intervale, vykonaná jedným analytikom. Opakovateľnosť je vykonaná buď prípravou 6 vzoriek v ich 100 % koncentrácii alebo prípravou troch vzoriek v 80 %, 100 % a 120 %.

Medziláhľá precíznosť (intermediate precision), vzorky sa testujú a porovnávajú rôznymi analytikmi, počas rôznych dní a pomocou rozdielneho vybavenia. Predstavuje mieru variability medzi laboratóriami a ukazuje presnosť, ktorú je možné očakávať v laboratóriu.

Reprodukovateľnosť metódy (reproducibility), vyjadruje precíznosť medzi laboratóriami. Rôzni analytici v rôznych laboratóriách pripravujú vlastné vzorky a štandardy a odmerajú ich na odlišných HPLC systémoch. (6, 10, 14)



Obr.9: Porovnanie presnosti a precíznosti a) dobrá presnosť a precíznosť b) zlá presnosť a dobrá precíznosť c) dobrá presnosť a zlá precíznosť d) zlá presnosť a precíznosť. (6)

3.3.3 Linearita

Linearita je schopnosť testovanej metódy poskytnúť výsledky, ktoré sú priamo úmerné koncentrácii analytu v danom rozsahu, uvádza sa ako variabilita sklonu regresnej krivky. Vzťah medzi odpoveďou detektora (peak area) a koncentraciou analytu. Koncentračné rozmedzie kde je odpoveď detektoru priamo úmerné ku koncentrácii analytu. Korelačný koeficient sa musí pohybovať v hodnote minimálne 0,99 aby bol pracovný postup platný. Pripraví sa aspoň 5 porovnávacích roztokov a zopakuje sa najmenej 5 meraní. (10, 15, 20, 26, 27)

Range je interval medzi vyššou a nižšou analytickou koncentraciou vzorku, ktorý ukazuje akceptovateľné hodnoty presnosti, precíznosti a linearity. (14)

3.3.4 Limit detekcie (LOD) a Limit kvantifikácie (LOQ)

Limit of detection (LOD) je definovaný ako najnižšia koncentrácia analytu vo vzorke, ktorý je merateľný ale nemusí byť kvantifikovaný, špecifikuje, či je analyt nad alebo pod danú hodnotu. Limit of quantification (LOQ), je najnižšia koncentrácia analytu vo vzorke, ktorý je možné kvantifikovať s prijateľnou precíznosťou a presnosťou. Výpočet LOQ a LOD je obdobný, pomer výšky peaku ku S/N (signal-to-noise), kde LOD má približne S/N okolo 3 a LOQ má 10, teda $LOQ = 3 LOD$. (10, 14)

3.3.5 Robustnosť

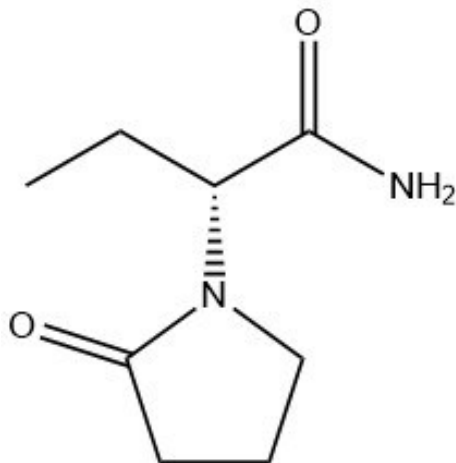
Robustnosť, miera výkonu metódy, keď sa vykonajú malé zmeny. Zámer tejto metódy je dokázať, ktoré podmienky sú najdôležitejšie pre jej úspešné prevedenie. Typické parametre na hodnotenie sú napr. zmena pH mobilnej fázy, zmena rýchlosti prietoku MF alebo zmena teploty kolóny. (10, 14)

3.3.6 Selektivita

Metóda je špecifická ak vie byť selektívna pre špecifický analyt alebo skupinu analytov. Selektivita je definovaná ako schopnosť presne zmerať prítomnosť analytu v prítomnosti rušiacich elementov, ktoré sa môžu nachádzať v analyzovanej vzorke. Na preukázanie selektivity sa zmeria blank a vzorka s analytom a ich chromatogramy sa následne porovnávajú. (10, 14)

3.4 Vybrané antiepileptiká

3.4.1 Levetiracetam



Obrázok č.10: Štruktúrny vzorec levetiracetamu. (28)

Systematický názov: (2R)-2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)butanamid

Štruktúrny vzorec: C₈H₁₄N₂O₂

Molekulová hmotnosť: 170,21 g/mol

Experimentálne zistené hodnoty

Teplota tavenia = 115 - 119 °C

logP = - 0,60

pKa = < -2 (chemická nestabilita)

Jedná sa o bielu kryštalickú látku vo forme prášku. Veľmi rozpustná vo vode (104 g/100 ml). Voľne rozpustná v chloroforme (65,3 g/100 ml), slabo rozpustná v acetonitrile (5,7 g/100 ml) a prakticky nerozpustná v n-hexanole. (28)

3.4.1.1 Farmakologické vlastnosti

Farmakodynamické vlastnosti

Mechanizmus účinku

Mechanizmus účinku Levetiracetamu, nie je úplne objasnený. Pokusy *in vitro* a *in vivo* naznačujú, že neovplyvňuje základné charakteristiky buniek ani normálne fungovanie buniek.

V *in vitro* štúdiách bolo zistené, že Levetiracetam ovplyvňuje hladinu vápniku v neurónoch, dosahuje to čiastočnou inhibíciou kalciových kanálov typu N a znížením uvoľňovania vápniku z intraneuronálnych zásob. Okrem toho čiastočne blokuje zníženie aktivity GABA-A glycinových kanálov spôsobené zinkom a beta-karbolínmi.

Farmakokinetické vlastnosti:

Levetiracetam je vysoko rozpustná látka s vysokou schopnosťou prieniku, vďaka úplnému a lineárnemu vstrebávaniu sa dajú predpovedať plazmatické hladiny levetiracetamu na základe perorálnej dávky vyjadrenej v mg/kg telesnej hmotnosti, kvôli tomu nie je nutné monitorovať plazmatické hladiny.

Absorpcia

Po perorálnom podaní sa Levetiracetam rýchlo vstrebáva do organizmu, pričom jeho absolútna biologická dostupnosť sa blíži k 100 %. Maximálnej plazmatickej koncentrácii (C_{max}) sa dosahuje 1,3 hodiny po podaní dávky a ustálený stav sa vytvára po necelých dvoch dňoch, pri dávkovaní dvakrát denne. Rozsah vstrebávania nie je ovplyvnený príjmom potravy a nezávisí na dávke.

Distribúcia

Momentálne nie sú k dispozícii žiadne údaje o distribúcii levetiracetamu v ľudských tkanivách. S ohľadom na bielkoviny krvnej plazmy, ani Levetiracetam, ani jeho primárny metabolit sa neviažu vo významnej miere (<10 %).

Biotransformácia

Levetiracetam nie je výrazne metabolizovaný v ľudskom organizme. *In vitro* a *in vivo* údaje o interakciách s perorálnymi kontraceptívami, digoxínom a warfarínom neukazujú, že by *in vivo* dochádzalo k významnej indukcii enzýmov. Z týchto dôvodov je interakcia levetiracetamu s inými látkami nepravdepodobná.

Eliminácia

Dospelí majú plazmatický polčas levetiracetamu okolo 7 ± 1 hodín, neodlišuje sa v závislosti na dávke, spôsobe podania alebo pri opakovanom podaní. Vylučuje sa prevažne glomerulárnou filtráciou s následnou tubulárnou reabsorpciou.

3.4.1.2 Klinické údaje

Terapeutické indikácie

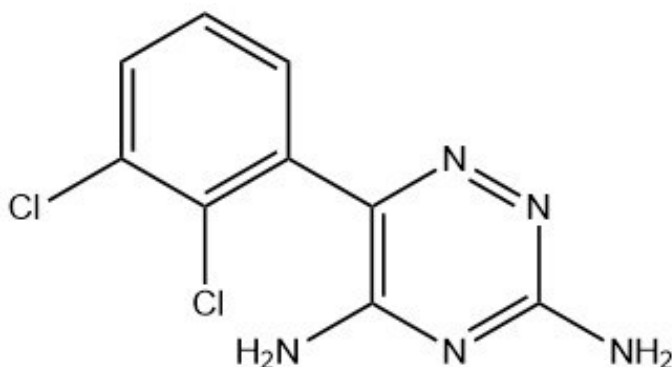
Levetiracetam je indikovaný pri monoterapii, pre liečbu parciálnych záchvatov s alebo bez sekundárnej generalizácie u dospelých a dospievajúcich od 16 rokov s novo diagnostikovanou epilepsiou. Ako prídavná terapia na liečbu parciálnych záchvatov s alebo bez sekundárnej generalizácie u dospelých, dospievajúcich, detí a kojencov od 1 mesiaca s epilepsiou.

Interakcie

Bolo zistené, že Levetiracetam neovplyvňuje sérové koncentrácie ostatných antiepileptík, ako sú Fenytoin, Karbamazepin, Kyselina valproová, Fenobarbital, Lamotrigin, Gabapentin, Primidon. Pri súčasnom podaní s methotrexátom je možné zníženie clearance tejto látky, to môže mať za následok predĺženie času v krvi pri koncentrácií, ktorá je potencionálne toxická.

Liečivá typu Digoxin, perorálne kontraceptíva, Warfarin neovplyvňujú jeho farmakokinetiku.
(29)

3.4.2 Lamotrigin



Obrázok č.11: Štruktúrny vzorec lamotriginu. (30)

Systematický názov: 6-(2,3-dichlorfenyl)-1,2,4-triazin-3,5-diamin

Štruktúrny vzorec: C₉H₇Cl₂N₅

Molekulová hmotnosť: 256,09 g/mol

Experimentálne zistené hodnoty

Teplota topenia = 177 - 181 °C

logP = 2,57

pKa = 5,7

Vzhľad: biely až krémovo sfarbený prášok

Rozpustnosť: Vo vode 170 mg/L , v 0,1M HCl 4,1 mg/ml (30)

3.4.2.1 Farmakologické vlastnosti

Farmakodynamické vlastnosti

Mechanizmus účinku

Farmakologické štúdie naznačujú, že Lamotrigin účinkuje blokovaním napätovo riadených sodíkových kanálov. Tento mechanizmus inhibuje rýchlo opakujúce sa akčné potenciály v neurónoch a ovplyvňuje uvoľňovanie glutamátu, čo je neurotransmitter zodpovedný za vznik epileptických záchvatov, pravdepodobne tieto účinky prispievajú k jeho antikonvulzívnym účinkom.

Farmakokinetické vlastnosti

Absorpcia

Lamotrigin sa vstrebáva z čriev, rýchlo a bezo zbytku a nie je ovplyvnený pečňovou metabolizáciou, jeho biodostupnosť je okolo 98 %. Maximálna plazmatická koncentrácia je pri perorálnom podaní dosiahnutá po 2,5 hodinách.

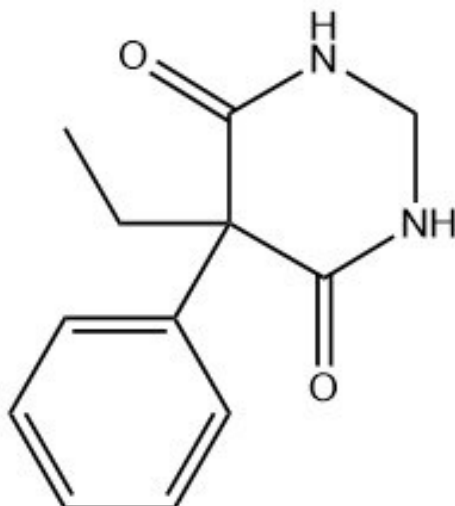
Distribúcia

Lamotrigin sa viaže na plazmatické bielkoviny zhruba z 55 %. Uvoľnenie z väzby na plazmatické bielkoviny by nemalo navodiť toxické prejavy.

Metabolizmus

Enzýmy zvané UDP-Glukuronyltransferázy zodpovedajú za metabolizmus lamotriginu. (31)

3.4.3 Primidon



Obrázok č.12: Štruktúrny vzorec primidonu. (32)

Systematický názov: 5-ethyl-5-fenyl-2,5-dihydro-4,6-pyrimidindiol

Štruktúrny vzorec: C₁₂H₁₄N₂O₂

Molekulová hmotnosť: 218,25 g/mol

Experimentálne zistené hodnoty

Teplota topenia = 281,5 °C

logP = 0,91

pKa = 12,3

Rozpustnosť: Slabo rozpustný vo vode 480 mg/L. (32)

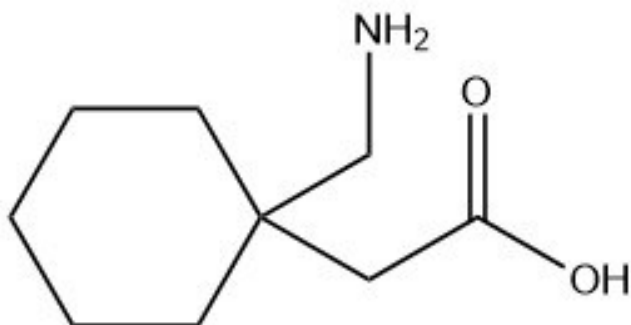
3.4.3.1 Farmakologické vlastnosti

Farmakodynamické vlastnosti

Mechanizmus účinku

Mechanizmus účinku nie je doposiaľ známy, predpokladá sa, že funguje na princípe hyperpolarizácie bunkových membrán. Primidon neovplyvňuje z neurochemického hľadiska koncentráciu GABA v mozgu ani jej metabolizmus. Jeho metabolity fenobarbital a fenylethylmalonamid (PEMA) majú antikonvulzívne účinky. (33)

3.4.4 Gabapentin



Obrázok č.13: Štruktúrny vzorec gabapentinu. (34)

Systematický názov: kyselina 2- [1-(aminomethyl)cyklohexyl]octová

Štruktúrny vzorec: C₉H₁₇NO₂

Molekulová hmotnosť: 171,24 g/mol

Experimentálne zistené hodnoty

Teplota topenia = 162 – 166 °C (34)

logP = 1,25

pKa = 3,7

Rozpustnosť: Voľne rozpustný vo vode

3.4.4.1 Farmakologické vlastnosti

Farmakodynamické vlastnosti

Mechanizmus účinku

Gabapentin ľahko prestupuje do mozgu, viaže sa na podjednotku alfa-2-delta napät'ovo riadených kalciových kanálov, predpokladá sa, že práve táto väzba je spätá s jeho antikonvulzívnymi účinkami. Napriek týmto poznatkom sa jeho MÚ ešte nepodarilo objasniť.

(35)

Terapeutické hodnoty

Liečivo	Terapeutické hodnoty (mg/L)	Spodná mez toxicity (mg/L)
Levetiracetam	12 – 46	100
Lamotrigin	3 - 15	20
Primidon	5 - 15	25
Gabapentin	2 – 20	25

Tabuľka č.1: Namerané terapeutické hodnoty antiepileptík. (36)

3.5 Spracovanie biologického materiálu

Príprava vzoriek je cieleňá technika na odstránenie balastov (proteíny, lipidy, soli) z biologického materiálu typu séra alebo plazmy. Tieto látky skomplikujú priebeh analýzy, keďže sú schopné poškodiť kolónu a iné súčasti HPLC systému. Zbavením sa týchto nežiadúcich súčastí, je možné zlepšiť senzitivitu, selektivitu a dôveryhodnosť analýzy. Prvý krok pri príprave vzorky je zaistenie jej úplného rozpustenia. Výber vhodného postupu spracovania biologického materiálu závisí od vlastností metabolitu, očakávanej koncentrácie atď. Centrifugácia je potrebná pri práci s biologickým materiálom akým sú aj červené krvinky, ktoré musia byť odstránené z testovanej vzorky aby mohla prebehnúť analýza bez komplikácií. Princípom centrifugácie je oddelenie ťažšej zložky analytu napr.červené krvinky od ľahšej časti, ktorá sa bude pipetovať do vialky. Rýchlosť otáčania a teplota pri ktorej sa centrifuguje, sú aspekty, ktoré dokážu ovplyvniť priebeh analýzy. (7, 37)

3.5.1 Deproteinácia

Protein precipitation (PP) je jednoduchá metóda, ktorá nachádza časté uplatnenie pri príprave plazmatických vzoriek. Využíva organické rozpúšťadla typu ACN/METH alebo kyselinu ako kys. perchlórová. Po pridaní rozpúšťadla nasleduje centrifugácia, ktorá spôsobí oddelenie proteínov od supernatantu. Najvhodnejšie rozpúšťadlo je acetonitril, keďže je častou MF a je viditeľný v UV od 190 nm. Odstránenie nabitých molekúl, ktoré by interagovali s kremíkom, ktorý je súčasťou SF. V sére sa najčastejšie nachádza albumin, nepolárny proteín, ktorý sa viaže na väčšinu hydrofóbnych látok. (37, 38)

3.5.2 Liquid-liquid extrakcia

Extrakcia kvapalina-kvapalina sa používa pre komplexnejšie vzorky, pretože ponúka horšiu precíznosť ako iné techniky, je vhodná pre biologické preparáty, u ktorých je tolerovaná nižšia precíznosť. Táto extrakcia je obtiažne automatizovaná. LLE je metóda prenosu hmoty, kde kvapalná vzorka je v kontakte s nemiešateľným rozpúšťadlom, ktorý vykazuje preferenčnú selektivitu k jednej alebo viacerým zložkám analytu, či už to je plazma alebo krv. (13, 15)

3.5.3 Solid phase extrakcia

Solid-phase extraction bola odvodená od LLE, je to kroková technika, kde analyt, ktorý je rozpustený v slabom rozpúšťadle, sa zachytí na stacionárnu fázu. Postupné pridávanie rozpúšťadiel s vyššiou silou znamená selektívne a kontrolované eluovanie analytov. Používa malé kolónky na zachytenie žiadaných analytov z kvapalného prostredia. SPE je založená na chromatografickej separácii, tak ako pri HPLC aj pri tejto metóde je na výber široká škála kolón, takže je vhodná pre polárne a nepolárne analyty. Malá kolóna typu C18 zachytáva prechádzajúci analyt, ten je následne premytý ACN alebo metanolom. Kolónky sa môžu znovu využiť pri ďalšej analýze. (13, 15)

4 Experimentálna časť

4.1 Technika a použité chemikálie

4.1.1 Prístrojová technika

Chromatografická zostava :

- | | |
|-----------------------------|---|
| • Komunikačný model | CBM-20A Shimadzu Corporation |
| • Degasser | DGU-20 A3 Shimadzu Corporation |
| • Čerpadlá | LC-20AD Shimadzu Corporation |
| • Autosampler | SIL-20AC Shimadzu Corporation |
| • Kolonový termostat | CTO-20AC Shimadzu Corporation |
| • UV-VIS detektor | SPD-20A Shimadzu Corporation |
| • DAD UV-VIS detektor | SPD-M20A Shimadzu Corporation |
| • Program pre zber dát | LabSolution, Version 5.85, Shimadzu Corporation |
| • pH meter | Schott CG 843, Schott Instruments GmbH,
Nemecko |
| • Vortex | WX Vortex, Velp Scientifica, Taliansko |
| • Digitálne analytické váhy | Sartorius CPA225D-0CE, Nemecko
Sartorius AG A200S, Nemecko |
| • Nylónové filtre | MS Nylon Membrane Filter, 0,22 µm, Membrane
Solutions |

4.1.2 Zoznam použitých chemikálií

Čistená, deionizovaná voda	Získaná pomocou reverznej osmózy
Dihydrogenfosforečnan draselný	Dr. Kulich Pharma s.r.o; Česká republika
Hydrogenfosforečnan sodný	Sigma Aldrich; Nemecko
Lamotrigin	Torrent Pharmaceutical Limited; India

Gabapentin	Sigma Aldrich; Nemecko
Levetiracetam	Sigma Aldrich; Nemecko
Primidon	Sigma Aldrich; Nemecko
Sulfathiazol	CRL technický sekretariát európskeho liekopisu; Štrasburg, Francúzsko
Metanol	VWR Chemicals; Francúzsko
Acetonitiril	VWR Chemicals; Francúzsko
Králičia plazma	
Sérum	

Reálne vzorky plazmy pacientov so známym obsahom antiepileptík získané z FN Hradec Králové.

4.2 Postupy a podmienky stanovení

4.2.1 Príprava roztokov analytov a mobilných fází

4.2.1.1 Roztoky analytov

- *Zásobné roztoky* boli pripravené do kryogénnych skúmaviek tak aby ich finálna koncentrácia činila 1000 mg/l v methanole. V prípade Gabapentinu sa používala 10x vyššia koncentrácia ako u ostatných látok.

Látka	Navážka [mg]	Methanol[ml]
LEVETIRACETAM	1,0	1,0
PRIMIDON	1,1	1,1
LAMOTRIGIN	1,6	1,6
GABAPENTIN	1,2	1,2
SULFATIAZOL	1,1	1,1

Tabuľka č.2: Zobrazenie prípravy zásobných roztokov.

- *Štandardné roztoky* boli pripravené priamo do vialiek na objem 1 ml riedením zásobných roztokov na koncentráciu 10 mg/l, buď metanolom alebo deionizovanou vodou, v prípade gabapentínu sa jednalo o 10x väčšiu koncentráciu, teda 100 mg/l.
- *Zmesný štandard* obsahoval levetiracetam, primidon a vnútorný štandard v koncentrácii 10 mg/l a gabapentín v koncentrácii 100 mg/l v celkovom objeme 1 ml.

4.2.1.2 Tlmivé roztoky

- *Základný tlmivý roztok o koncentrácii 10 mM*, bolo navážení 1,361 g dihydrogenfosforečnanu draselného, kvantitatívne bol prenesený do odmernej banky, kam bolo pridaných po rysku 1000 ml deionizovanej vody. Druhá zložka pufru, hydrogenfosfát disodný, bol navážení v hodnote 1,420 g a následne bol rozpustený v 200 ml deionizovanej vody v menšej odmernej banke. Odobralo sa 950 ml dihydrogenfosforečnanu draselného a 50 ml hydrogenfosfát disodného, boli zmiešané do spoločnej kadičky a pomocou pH-metra bola odmeraná finálna hodnota pH = 5,6. Následne bol roztok prefiltrovaný cez 0,22 µm nylonový filter do zásobnej fľaše. (39)
- *Tlmivý roztok 5 mM*, bol pripravený zriedením 10 mM roztoku v pomere 1:2 (roztok: voda). Bola odmeraná hodnota pH = 5,79 a následne bol prefiltrovaný cez 0,22 µm nylonový filter do zásobnej fľaše.
- *Tlmivý roztok 15 mM*, bol pripravený rovnakým postupom ako pri príprave 10 mM pufru, s navážkami 2,041 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 2,129 g hydrogenfosfátu disodného. Namerané pH pomocou pH-metra bolo 5,57 g prefiltrovaný cez 0,22 µm nylonový filter do zásobnej fľaše.

Príprava roztokov (ZMES1-ZMES5) na linearitu

LČ	ZMES1S (μ L)	ZMES2S (μ L)	ZMES3S (μ L)	ZMES4S (μ L)	ZMES5S (μ L)
GABA	10 (100 μ g/ml)	50 (100 μ g/ml)	10 (1mg/ml)	20 (1mg/ml)	30 (1mg/ml)
LEVE	10 (1mg/ml)	20	30	80	150
SLT	20 (1mg/ml)	20	20	20	20
PD	10 (100 μ g/ml)	50 (100 μ g/ml)	10 (1mg/ml)	20 (1mg/ml)	30 (1mg/ml)
LAMO	10 (100 μ g/ml)	50 (100 μ g/ml)	10 (1mg/ml)	20 (1mg/ml)	30 (1mg/ml)
METH	940	810	920	840	740

Tabuľka č.3: Zobrazenie objemu v μ L analytov v zmesiach.

Postup izolácie z plazmy resp. séra

- Bolo odobraných 50 μ L plazmy, ktorá bola kvantitatívne prevedená do „eppendorfky“, bol pridaný precipitačný roztok ACN:METH v pomere 1:1 v objeme 500 μ L s prídavkom IS v koncentrácii 20 μ g/ml, okrem hodnotenia selektivity.
- Následne bola zmes intenzívne zvortexovaná po dobu 30 sekúnd a bola zcentrifugovaná pri teplote 4 °C, 15 minút pri 15 000 otáčok za minútu.
- Nakoniec bola opatrne odobratá vrchná časť, ktorá bola pomocou pipety premiestnená do vialky.

4.2.1.3 Mobilná fáza

Mobilná fáza bola uchovaná v zásobných fľašiach, s deionizovanou vodou a acetonitrilom, a fosfátovým pufrom v určitej koncentrácii. Tieto zložky sa miešali podľa daného gradientu.

4.2.2 Chromatografické podmienky a proces ich optimalizácie

Pre stanovenia boli zvolené nasledujúce chromatografické podmienky:

- **Kolóna:** Agilent Eclipse XDB-Phenyl 5 μm (4,6mm x 150mm)
(ACE 3 C18 – PFP 100 x 4,6 mm; Kinetex 5 μm C18 150 x 4,6 mm)
- **Teplota:** 35-50 $^{\circ}\text{C}$
- **Prietok:** 0,8 – 1,0 ml/min
- **Injektovaný objem:** 10 μL
- **Detekcia:** 210 - 220 nm

Pre porovnanie sú nižšie uvedené chrom. podmienky v BP Martina Smolíka.

Chromatografické podmienky v BP Martina Smolíka:

- Kolóna: Kinetex 5 μm C18 150 x 4,6 mm, Phenomenex
- Teplota: 35 $^{\circ}\text{C}$
- Prietok MF: 0,8 ml/min
- Injektovaný objem: 10 μL
- Detekcia: pomocou diodového poľa v oblasti 200-300 nm (39)

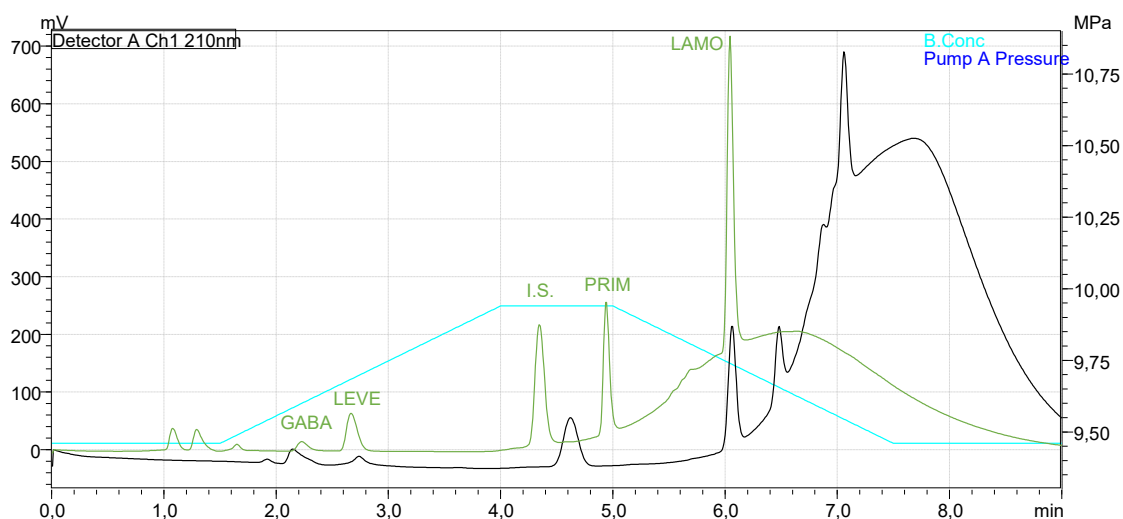
5 Výsledky a diskusia

5.1.1 Retenčné chovanie analytov

5.1.2 Tvorba gradientu pre analýzu vybraných antiepileptik

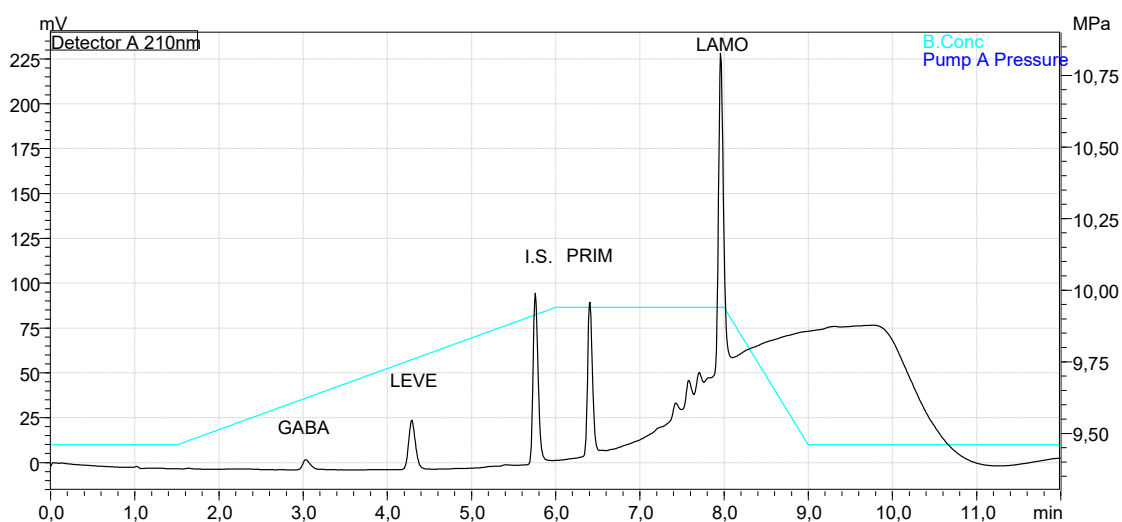
V náväznosti na bakalársku prácu Martina Smolíka sa testovala ním použitá kolóna Kinetex 5 μm C18 150 x 4,6 mm, Phenomenex, s cieľom zlepšiť rozlíšenie medzi píkmi primidonu a lamotriginu. Táto SF bola použitá pri počiatočnom meraní isokratickej elúcie na prvom HPLC zariadení, pri tejto kolóne bol problém s tlakom a taktiež HPLC zostava mala problematickú pumpu. Z týchto dôvodov sa analýza presunula na druhé zariadenie s rovnakou SF. Ani na tomto zariadení neboli dosiahnuté optimálne výsledky, preto sa učinilo rozhodnutie o zmene SF na Agilent Eclipse XDB-Phenyl 5 μm (4,6mm x 150mm), na ktorej bolo vyskúšaných väčšina gradientov a následná validácia výsledkov. Ďalšou testovanou kolónou resp. SF, bola ACE 3 C18 – PFP 100 x 4,6 mm. Obrázok č.14 porovnáva chromatogramy dvoch SF, kedy boli prevedené zmeny v gradiente, ktoré nevedli k zlepšeniu separácie. Z týchto dôvodov bola zvolená kolóna Agilent Eclipse XDB-Phenyl, pre ďalšie merania.

V priebehu analýzy sa upustilo od stanovenia gabapentinu, kvôli jeho retenčným vlastnostiam resp. jeho nízkym absorbným schopnostiam pri očakávanej terapeutickej hladine.



Obrázok č.14: Porovnanie SF *ECLIPSE* (zelená) a *ACE3* (čierna), pri použití rovnakého gradientu.

Z dôvodu zmeny SF bolo potrebné vytvoriť nový gradient, ktorý by zabezpečil ideálne chromatogramy. Pri tvorbe gradientu, je potrebné dosiahnuť dostatočnú separáciu medzi jednotlivými analytmi. Pre zvolenú SF Agilent Eclipse XDB-Phenyl, bolo nutné urobiť zmeny gradientu a zároveň zachovať dostatočné rozlíšenie medzi jednotlivými analytmi a IS (Sulfathiazol), ktorý bol použitý rovnako ako v BP Martina Smolíka. Ďalšou požiadavkou bola optimálna symetria pík a čo najkratšia doba analýzy. Vlnová dĺžka pre detekciu bola vybraná v hodnotách 210 nm, kedy sa absorbovala väčšina analytov, pri vyšších hodnotách ako 220 nm sa už neabsorboval Gabapentin, preto nebola u neho hodnotená už ani linearita, aj keď bol obsiahnutý v zmesných roztokoch. V priebehu analýzy sa od jeho detekcie upustilo a tým bolo umožnené použitie vlnovej dĺžky 220 nm, kedy bol nižší šum pozadia a stále dostatočná absorpcia ostatných látok.

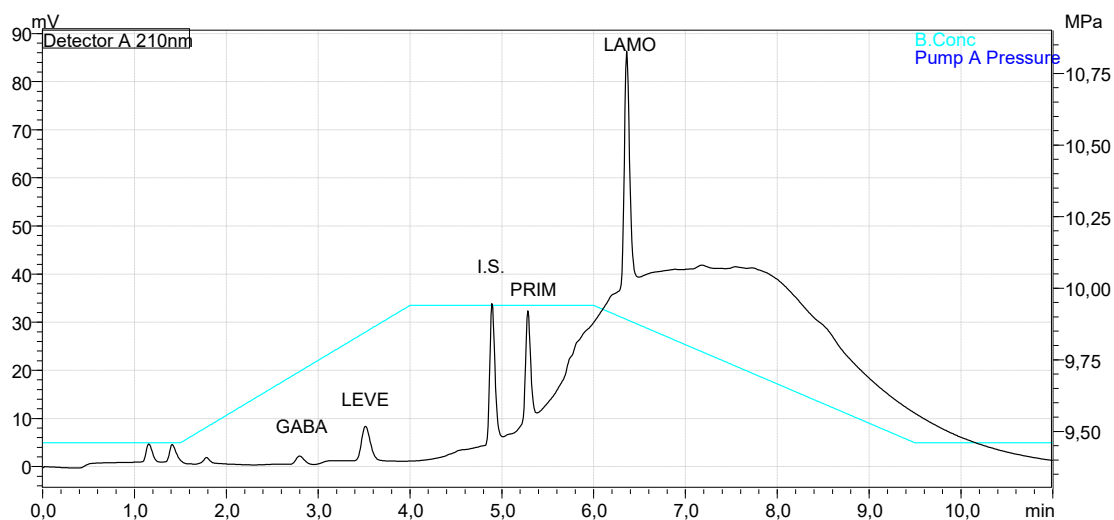


Obrázok č.15: Chromatogram gradientu 1.

Popis: *čierna* – zmesná vzorka ; *svetlo modrá* – priebeh gradientu na pumpe B

Čas (min)	Pumpa B (%)
1,50	10
6,00	40
8,00	40
9,00	10
11,00	10

Nastavený gradient 1 zobrazuje na začiatku Gabapentin, Levetiracetam, vnútorný štandard (Sulfathiazol), Primidon a na konci Lamotrigin. Práve posledná látka sa v isokratickej elúcii eluovala v hodnotách okolo 12 minút, zmenou gradientu je možné dosiahnuť jeho posun bližšie k ostatným látkam a tým skrátenie celkovej doby analýzy.

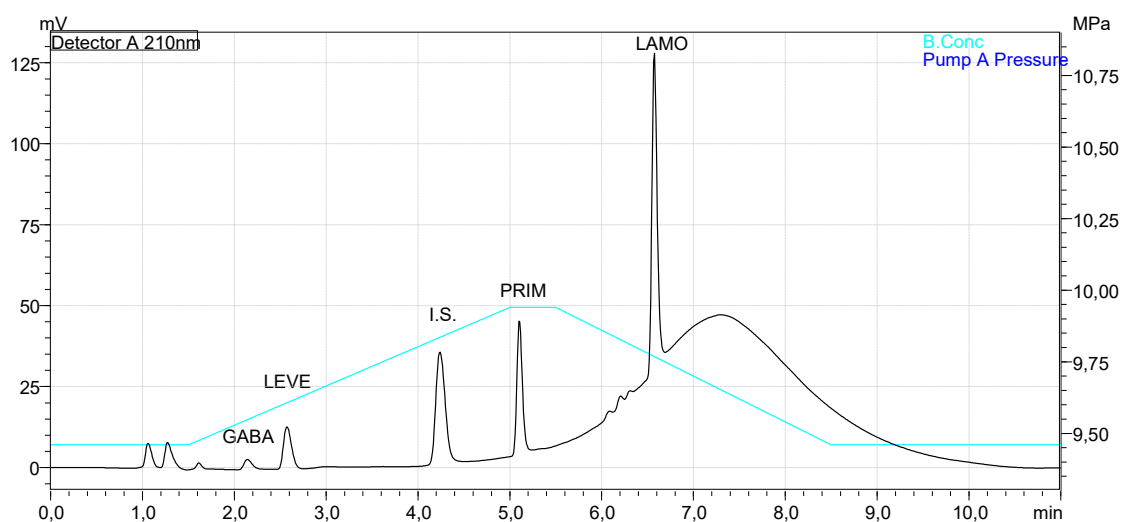


Obrázok č.16: Chromatogram s gradientom 2.

Popis: čierna – zmesná vzorka ; svetlo modrá – priebeh gradientu na pumpě B

Čas (min)	Pumpa B (%)
1,50	10
4,00	40
6,00	40
9,50	10
11,00	10

Vytvorením gradientu 2, bolo zamýšľané skrátenie času celkovej analýzy. Retenčný čas všetkých analytov sa skrátil, najvýraznejšiu zmenu retencie zaznamenal Lamotrigin a to z 8,0 min na 6,4 min. Najvýraznejšie zmenšenie rozlíšenia bola nameraná medzi píkmi LEVE a GABA. Zmenou gradientu, je možné ďalej docieľiť zvýšenie rozlíšenia medzi PRIM a I.S., z tohto dôvodu, bol vytvorený gradient 3. Symetria píkova bola v rozmedzí 1,05 až 1,10.

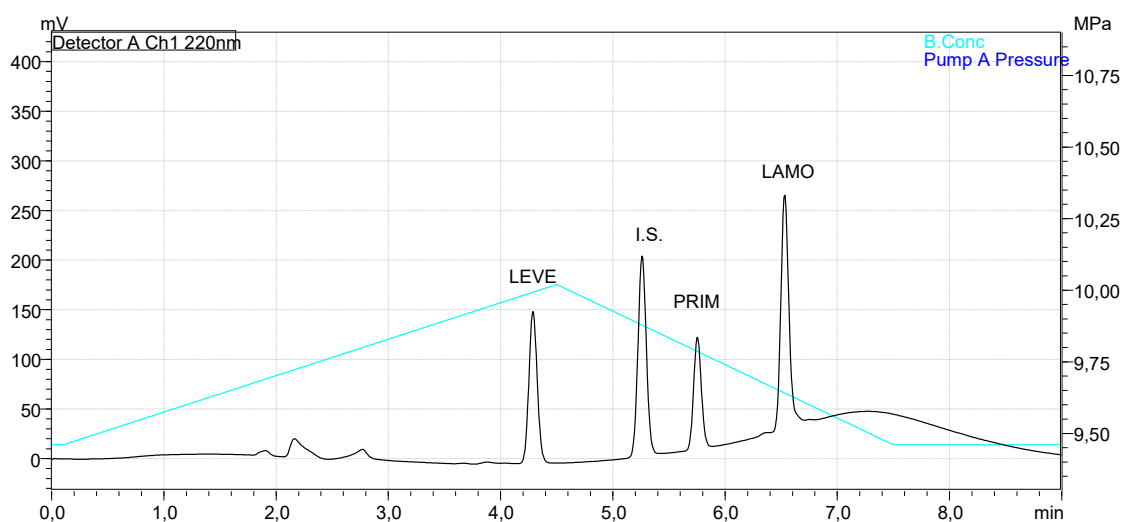


Obrázok č.17: Chromatogram gradientu 3.

Popis: čierna – zmesná vzorka ; svetlo modrá – priebeh gradientu na pumpe B

Čas (min)	Pumpa B (%)
1,50	10
5,00	40
5,50	40
8,50	10
11,00	10

Tretí gradient bol vytvorený, tak aby sa ďalej skrátila celková analýza a taktiež aby bol menej výrazný nárast tlaku na priebehu chromatogramu a zároveň znížením rozlíšenia, sa skrátili rozostupy medzi analytmi . Celková analýza trvala 11 minút, kedy sa po 7,0 minúte už neeluuje žiadny ďalší analyt, z tohto dôvodu bol vytvorený gradient 4, aby sa skrátila celková analýza pod 10 minút. Teda možnosťou ďalšej úpravy gradientu bola v rýchlejšom zvýšení organickej zložky a zmenšením času potrebného pre ustálenie tlaku na pumpe.



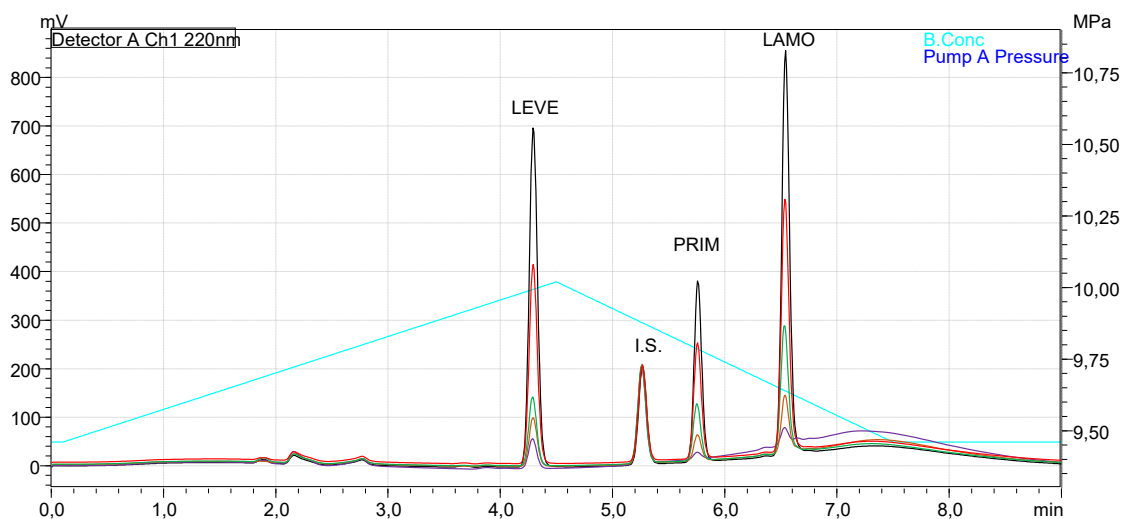
Obrázok č.18: Chromatogram s gradientom 4.

Popis: čierna – zmesná vzorka ; svetlo modrá – priebeh gradientu na pumpe B

Čas (min)	Pumpa B (%)
0,10	10
4,50	45
6,50	10
8,00	10

Počas analýzy bolo rozhodnuté, že pri danej vlnovej dĺžke a koncentrácii gabapentínu vo vzorke, sa upustí od jeho sledovania. Vlnová dĺžka bola nastavená na 220 nm. V tomto prípade bol GABA spojený s píkmi balastov na začiatku analýzy. Tento gradient bol určený ako finálny a následne bol využitý v ďalších analýzach. Zvýšením organickej zložky na začiatku analýzy bola dosiahnutá elúcia analytov v rozmedzí 2,5 minút so znížením rozlíšenia medzi LAMO a PRIM v hodnote 5,48. Rozlíšenie medzi I.S. a LEVE je 6,44 a PRIM a I.S. je 3,35. Symetria pík (tailing faktor), od najmenšieho: I.S. 1,05; LEVE 1,06; PRIM 1,07 a LAMO 1,15, čo vyhovuje požiadavkám FN HK min. rozlíšenie 2,0 a symetrie pík 0,8 - 1,2. Celková doba analýzy bola skrátaná na 9,0 minút.

Záznam finálnych chromatografických podmienok pre roztoky označené ZMES1-5.



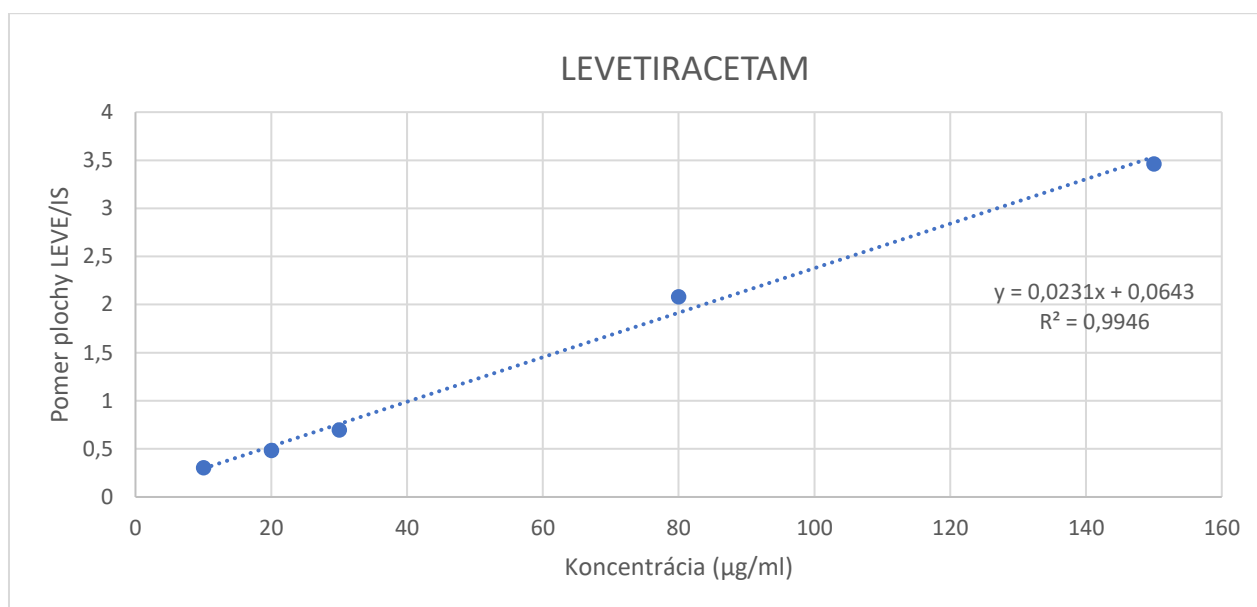
Obrázok č.19: Zobrazenie zvyšujúcej sa koncentrácie od najnižšej konc. po najvyššiu:
zmes1- *fialová*; zmes 2 - *oranžová*; zmes3 - *zelená*; zmes4 - *červená*; zmes5 – *čierna*.

5.1.3 Validácia metódy

- Metóda validovaná pre analyty v plazme mala nasledujúce parametre
- Preanalytická úprava: Príprava vzorkov, plazmy a plazmy s LČ, je popísaný v kapitole [4.2.1](#)
- Kolóna: Agilent Eclipse XDB-Phenyl 5 μm (4,6mm x 150mm)
- Mobilná fáza: Tlmivý roztok (5, 10, 15 mM) a ACN
- Prietok: 0,8 ml/min
- Teplota: 40 °C
- Detekcia pri vlnovej 220 nm
- Doba analýzy: 9 minút
- Nástrek: 10 μL

5.1.3.1 Linearita

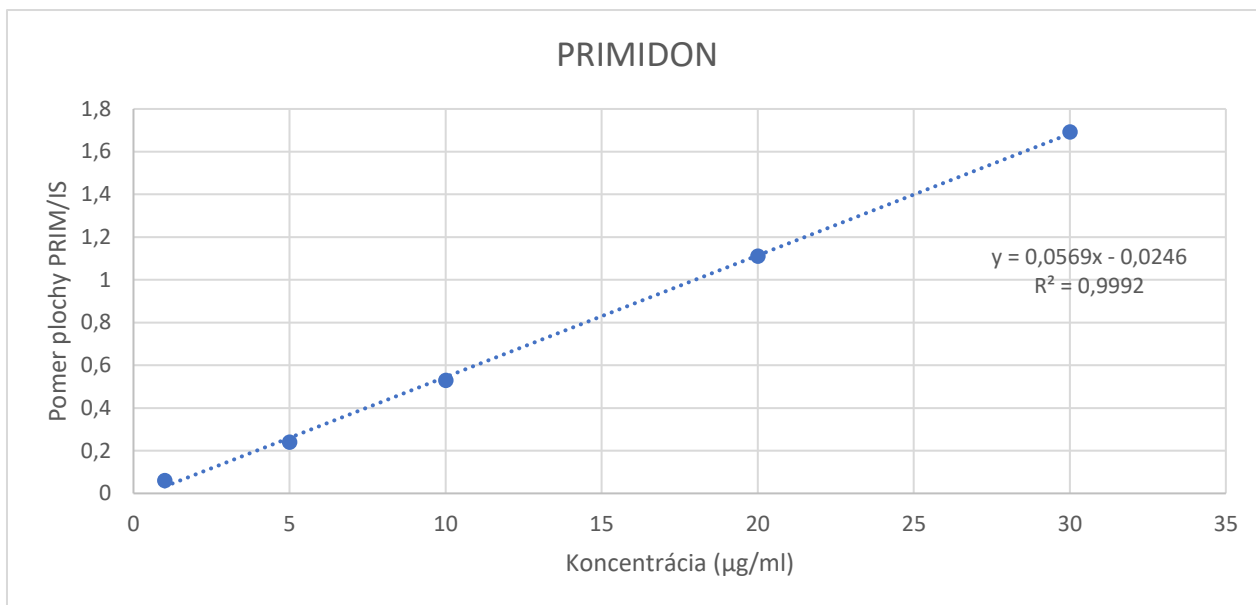
Kalibračná krivka bola meraná na 5 koncentračných hladinách, namerané hodnoty boli spriemerované z dvoch vialiek. Vypočítané koncentrácie sa pohybujú v terapeutickom rozmedzí a hodnoty nad 100 % sú hodnoty toxické. Koncentrácie sú zvolené, aby pokrývali terapeutické rozmedzie a posledný kalibračný bod je na hranici toxicity pre daný analyt. Po zostrojení krivky bola získaná rovnica pre výpočet presných koncentrácií a determinačný koeficient R^2 . Korelačný koeficient u LEVE je 0,997; PRIM 0,999; LAMO 0,999, odpovedajú validačnej požiadavke $R \geq 0,99$.



Obrázok č.20: Graf závislosti pomeru plochy píku LEVE/IS a koncentrácie (µg/ml).

Koncentračná hladina	Koncentrácia (µg/ml)	A_S LEVE / A_S I.S.
12,5 %	10	0,305
25 %	20	0,485
37,5 %	30	0,696
100 %	80	2,083
187,5 %	150	3,463

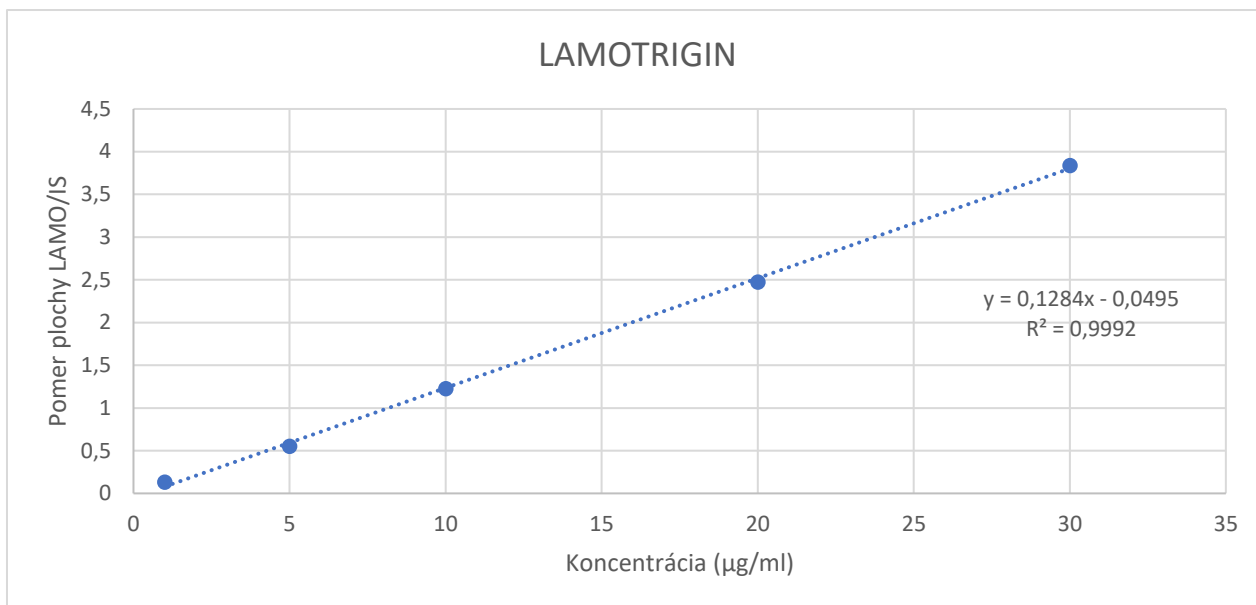
Tabuľka č.4: Hodnoty kalibračnej krivky.



Obrázok č.21: Graf závislosti pomeru plochy píku PRIM/IS a koncentrácie (µg/ml).

Koncentračná hladina	Koncentrácia (µg/ml)	As LEVE / As I.S.
5 %	1	0,060
25 %	5	0,240
50 %	10	0,530
100 %	20	1,112
150 %	30	1,692

Tabuľka č.5: Hodnoty kalibračnej krivky.



Obrázok č.22: Graf závislosti pomeru plochy piku LAMO/IS a koncentrácie (µg/ml).

Koncentračná hladina	Koncentrácia (µg/ml)	As LEVE / As I.S.
5 %	1	0,133
25 %	5	0,554
50 %	10	1,226
100 %	20	2,475
150 %	30	3,839

Tabuľka č.6: Hodnoty kalibračnej krivky.

5.1.4 Precíznosť

Precíznosť bola meraná na troch koncentračných hladinách, na každej hladine boli pripravené 3 vzorky. RSD spĺňa predpísaný limit ≤ 15 %. Hodnoty sú uvedené v tabuľkách č.7, 8 a 9. Všetky testované analyty spĺňajú predpísaný limit.

5.1.5 Presnosť

Presnosť bola meraná na troch koncentračných hladinách LEVE (25 %, 100 % a 187,5 %) a PD, LAMO (25 %, 100 % a 150 %).

Po zmeraní vzoriek s prídavkom bola vypočítaná skutočná koncentrácia prídavku. Presnosť metódy sa má pohybovať medzi 85-115 % skutočnej hodnoty, čomu namerané hodnoty vyhovujú.

LEVE

Koncentračná hladina	Koncentrácia prídavku [$\mu\text{g/ml}$ plazmy]	Pomer plochy analyt/IS	Priemer pomeru	Vypočítaná koncentrácia prídavku [$\mu\text{g/ml}$ plazmy]	Výt'aznosť [%]	Priemerná výt'aznosť [%]	RSD [%]
25 %	20	0,498	0,482	18,76	106,63	110,60	3,386
		0,465		17,35	115,26		
		0,485		18,20	109,89		
100 %	80	2,011	2,089	84,28	94,92	91,40	4,768
		2,202		92,52	86,47		
		2,055		86,19	92,82		
187,5 %	150	3,667	3,409	155,97	96,17	103,91	6,806
		3,344		141,97	105,66		
		3,217		136,49	109,89		

Tabuľka č.7: Presnosť a precíznosť metódy pri analyte LEVE.

PRIM

Koncentračná hladina	Koncentrácia prídavku [µg/ml plazmy]	Pomer plochy analyt/IS	Priemer pomeru	Vypočítaná koncentrácia prídavku [µg/ml plazmy]	Výt'aznosť [%]	Priemerná výt'aznosť [%]	RSD [%]
25 %	5	0,245	0,246	4,73	105,65	105,42	5,437
		0,233		4,53	110,49		
		0,260		4,99	100,13		
100 %	20	1,205	1,163	21,61	92,55	95,91	3,937
		1,114		20,01	99,93		
		1,170		21,00	95,24		
150 %	30	1,758	1,703	31,33	95,77	98,86	2,960
		1,693		30,18	99,40		
		1,659		29,58	101,41		

Tabuľka č.8: Presnosť a precíznosť metódy pri analyte PRIM.

LAMO

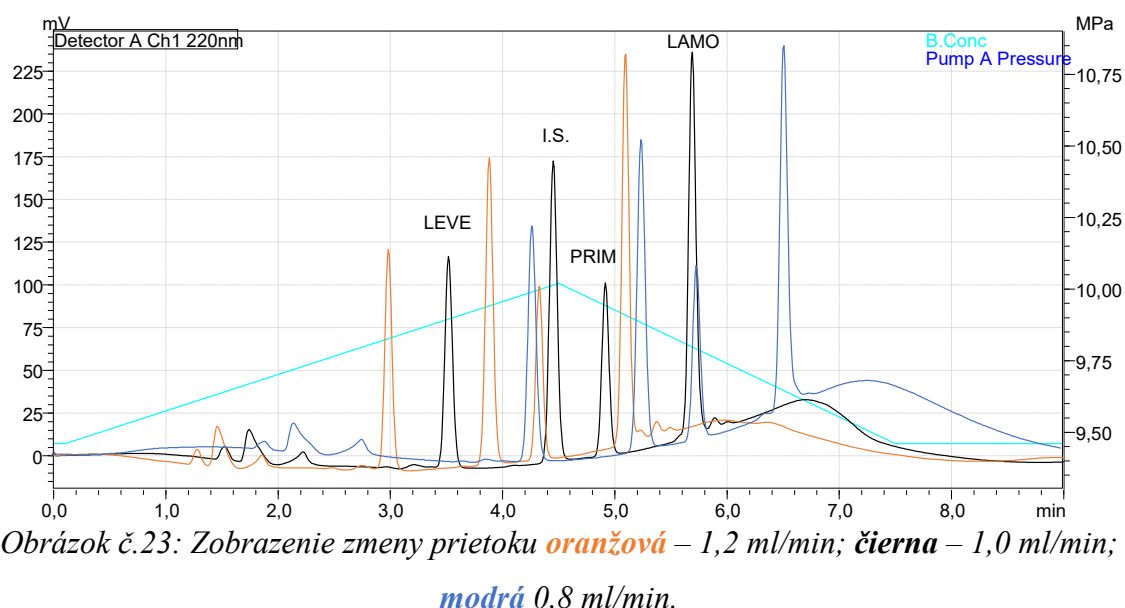
Koncentračná hladina	Koncentrácia prídavku [µg/ml plazmy]	Pomer plochy analyt/IS	Priemer pomeru	Vypočítaná koncentrácia prídavku [µg/ml plazmy]	Výt'aznosť [%]	Priemerná výt'aznosť [%]	RSD [%]
25 %	5	0,575	0,5507	4,87	102,74	107,08	4,331
		0,549		4,66	107,31		
		0,528		4,50	111,21		
100 %	20	2,622	2,4756	20,81	96,12	101,87	5,223
		2,378		18,91	105,79		
		2,427		19,28	103,71		
150 %	30	3,784	3,8880	29,86	100,48	97,87	2,566
		3,983		31,41	95,52		
		3,897		30,73	97,62		

Tabuľka č.9: Presnosť a precíznosť metódy pri analyte LAMO.

5.1.5.1 Robustnosť

Robustnosť metódy, porovnáva zmenu chromatografických podmienok na elučných vlastnostiach analytov. Testovaná bola zmena prietoku v rozmedzí 0,8 – 1,2 ml/min, zmena teploty kolóny (35 - 45 °C), zmena koncentrácie pufru (5 mM – 15 mM), zmena pomeru zložiek fosfátového pufru dihydrogenfosforečnan draselný:hydrogenfosforečnanu sodný (370:30 – 390:10).

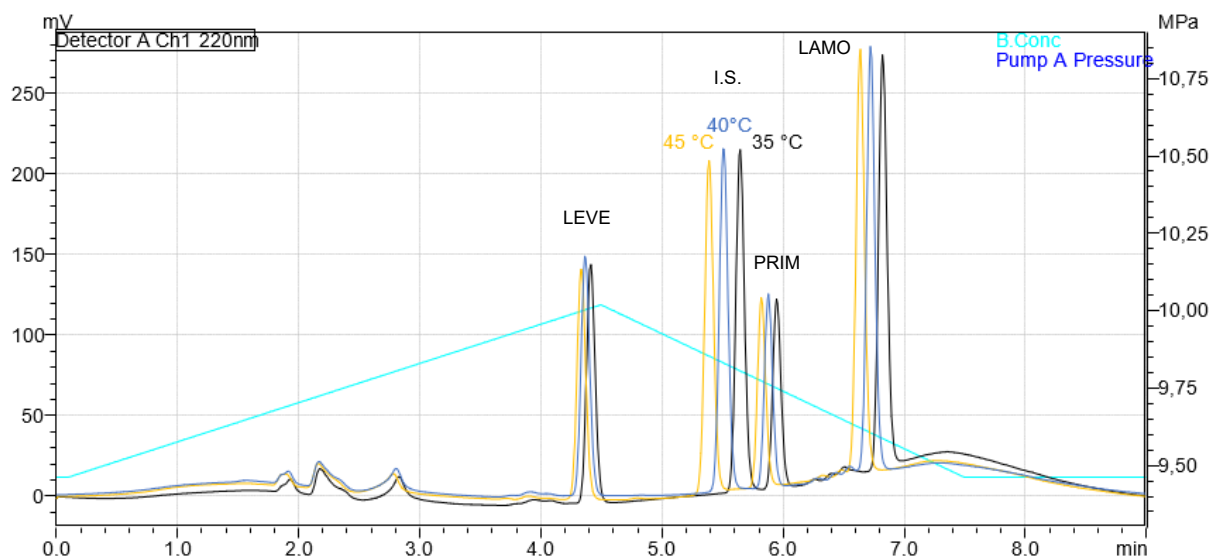
- **Zmena prietoku**



Obrázok č.23: Zobrazenie zmeny prietoku *oranžová* – 1,2 ml/min; *čierna* – 1,0 ml/min; *modrá* 0,8 ml/min.

Na chromatogramoch sa porovnáva aký vplyv má rýchlosť prietoku MF na retenčné vlastnosti analytov. Podľa očakávania, čím rýchlejší prietok, tým sa budú analyty skôr eluovať a tým pádom sa skrátí čas analýzy a tiež retenčný čas analyzovaných látok. Tailing factor zostáva v rovnakých hodnotách, v rozmedzí 1,05 až 1,15. Rozlíšenie jednotlivých analytov je dostatočujúce, najmenšia nameraná hodnota je 3,24 pre PRIM a I.S. pri prietoku 1,2 ml/min. Vzhľadom k neustálym problémom s tlakom na kolóne, sa v nasledujúcich meraniach použil prietok MF pri 0,8 ml/min.

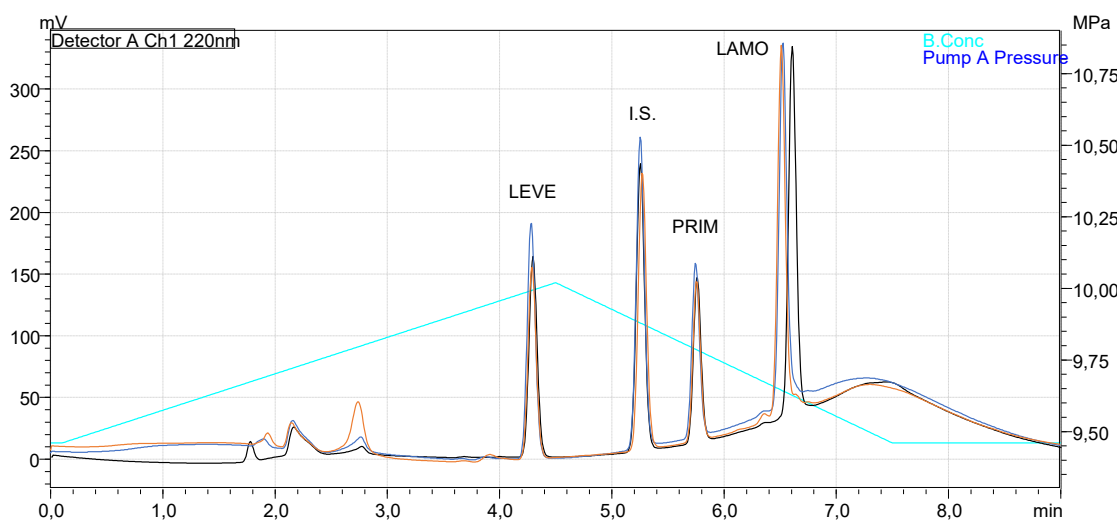
- **Zmena teploty**



Obrázok č.24: Zobrazenie zmeny teploty: **čierna** – 35 °C, **modrá** – 40 °C a **žltá** – 45 °C.

Boli testované tri teploty: 35 °C, 40 °C, 45 °C. Zvýšením teploty sa skrátila doba analýzy a nastal aj posun píkov najmä analytov interného štandardu, primidonu a lamotrigínu. Tailing faktor sa pohyboval pri analytoch v rozmedzí od 1,07 až 1,11. Hodnota rozlíšenia sa pri zvyšujúcej sa teplote zmenšovala napr. pre PRIM a I.S. z 8,33 (35 °C) na 7,04 (45 °C). Optimálna teplota kolóny na analýzu bola zvolená pri 40 °C.

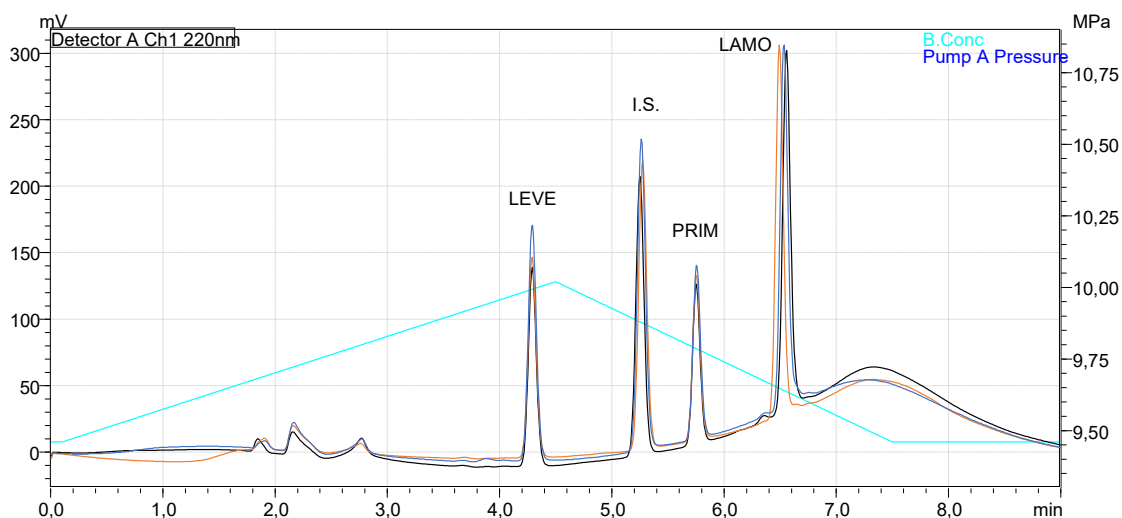
- **Zmena molárnej koncentrácie pufru**



Obrázok č.25: Zobrazenie zmeny molárnej koncentrácie pufru **čierna** – 5 mM; **modrá** 10mM; **oranžová** – 15 mM.

Pri zmenení molárnej koncentrácie pufru nastáva mierny posun lamotrigínu na konci analýzy. Tailing faktor sa pohybuje v rozmedzí 1,06 až 1,15. Rozlíšenie jednotlivých analytov sa signifikatne nezmenila, najmenšia nameraná hodnota je 3,29 pre PRIM a I.S. pri použití pufru o koncentracii 15 mM. Najideálnejšia koncentrácia pufru bola 10 mM, s touto konc. sa pracovalo aj v nasledujúcich analýzach.

- **Zmena pomeru Dihydrogenfosforečnan draselný:Hydrogenfosforečnanu sodný**

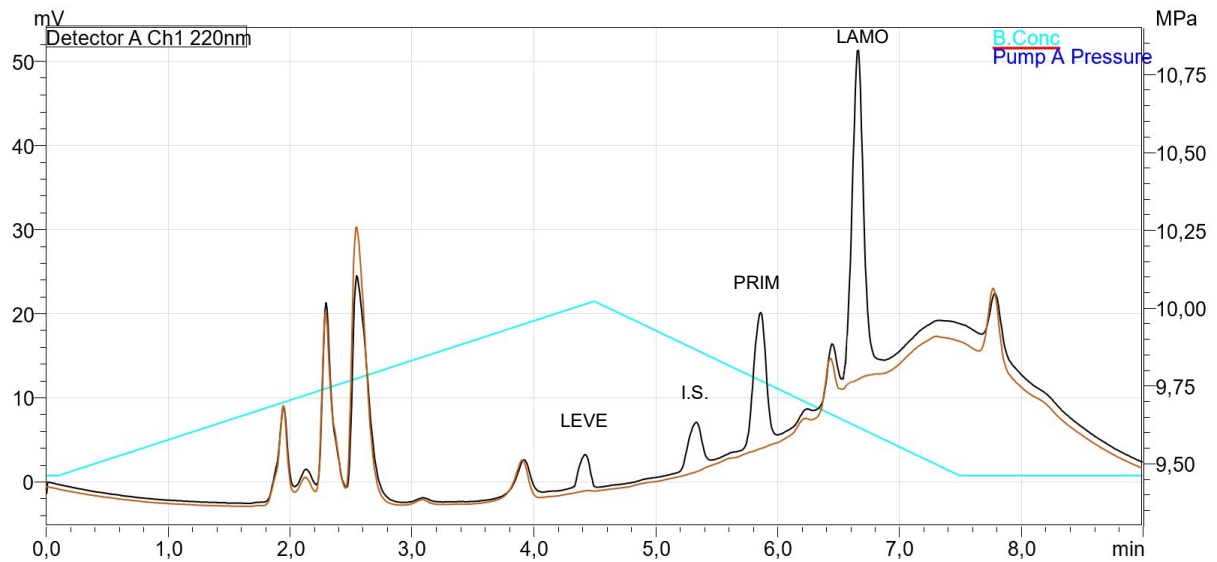


Obrázok č.26: Zobrazenie zmeny molárnej koncentrácie pufru **čierna** – 370:30; **modrá** 380:20; **oranžová** – 390:10.

Bolo testované aj zloženie pufru, kedy sa menil pomer dihydrogenfosforečnanu draselného 370, 380 a 390 ml ku 30, 20 a 10 ml hydrogenfosforečnanu sodného. Pri žiadnom analyte nenastal výraznejší posun. Tailing faktor sa pohybuje v rozmedzí 1,04 až 1,11. Rozlíšenie jednotlivých analytov je dostačujúce. Pri zmene pomeru látok v pufri sa nemení rozlíšenie, najmenšia nameraná hodnota pre PRIM a I.S. bola 3,26.

5.1.6 Selektivita

Pre testovanie selektivity bola použitá čistá plazma a plazma s analytmi v koncentrácii zmesi 3. Chromatogram na obrázku č.27 znázorňuje neprítomnosť interferujúcich látok v retenčných časoch stanovovaných analytov.

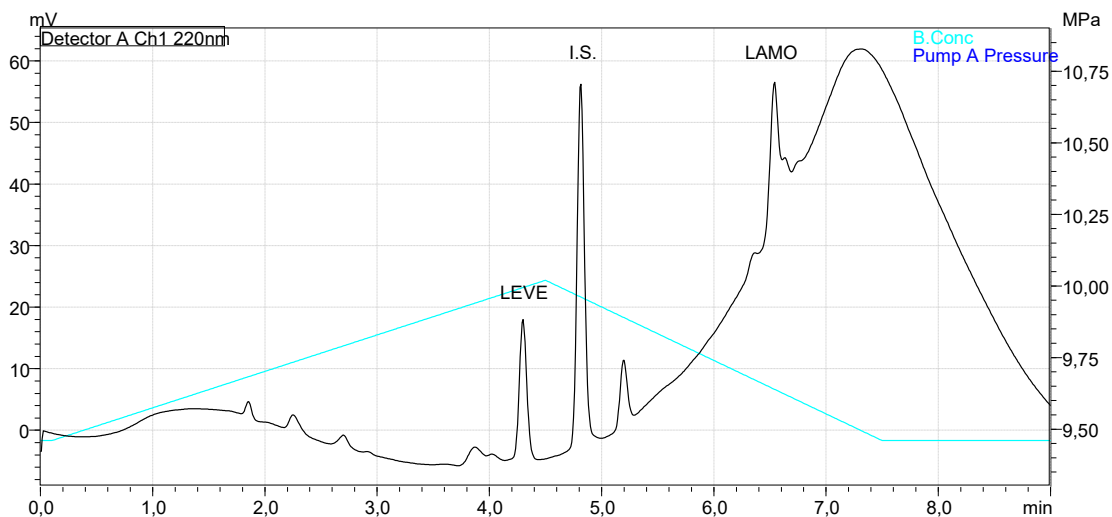


Obrázok č.27: Zobrazenie čistej plazmy (*hnedá*) a plazmy s analytmi (*čierna*).

5.1.7 Analýza reálnych vzoriek

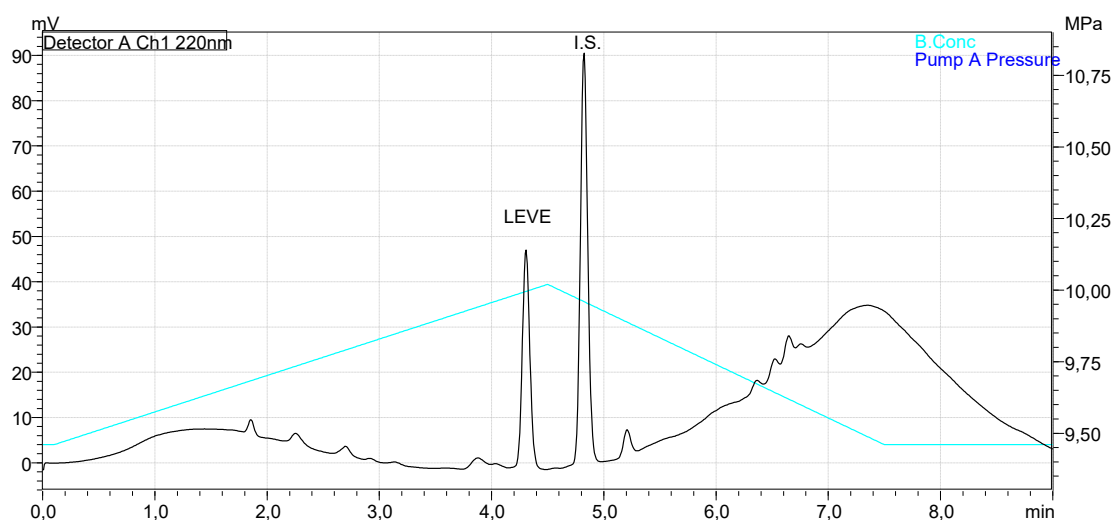
Reálna vzorka pacienta s obsahom levetiracetamu a lamotriginu bola spolu s kontrolnou vzorkou testovaná pomocou gradientu 4. Vzorky s obsahom primidonu neboli v dobe merania diplomovej práce dostupné.

Jednalo sa už o pripravené izoláty z plazmy z FN HK, ktoré boli bez ďalšej úpravy nastreknuté a zanalyzované. Pripravené boli podľa interného predpisu úseku farmakológie FN v Hradci Králové. Bolo iba porovnávané či sa LEVE a LAMO eluujú v rovnakých retenčných časoch ako naše modelové vzorky. Kvantifikácia nebola prevedená, pretože v izolátoch bol používaný iný interný štandard ako v našich vzorkách.



Obrázok č.28: Chromatogram plazmatického izolátu s I.S. s obsahom levetiracetamu a lamotriginu, patientska vzorka (Pac10).

Popis: V rozmedzí 2,0 až 4,0 minút boli eluované balasty z plazmy. V retenčnom čase 4,2 min je pík levetiracetamu, v čase 4,8 min je pík I.S. (z FN HK, 2-(2,2dimethyl-5-oxopyrrolidin-1-yl)propanamid), v čase 5,2 min sa eluuje neznáma látka (bola by potrebná ďalšia analýza), v čase 6,6 min sa eluuje s balastmi Lamotrigin.



Obrázok č.29: Chromatogram plazmatického izolátu s I.S. s obsahom levetiracetamu, patientska vzorka („Pac9“).

Popis: V rozmedzí 2,0 až 4,0 min. sa elujú balasty z plazmy. V retenčnom čase 4,2 min. je pík levetiracetamu, v čase 4,8 je pík interného štandardu (z FN HK, 2-(2,2dimethyl-5-oxopyrrolidin-1-yl)propanamid), v čase 5,2 min sa eluje neznáma látka a v čase 6,4 sa elujú balasty.

Na oboch chromatogramoch sa v zhodných retenčných časoch elujú u pacienta 10 Levetiracetam a Lamotrigin a u pacienta 9 sa eluje levetiracetam, tak ako v modelových vzorkách. To by odpovedalo očakávanému obsahu analytov uvedených u týchto patientskych vzorkách.

6 Záver

Táto diplomová práca sa vo svojej teoretickej časti zaoberá popisom zloženia HPLC zostavy, kde bol bližšie priblížený proces separácie, ako aj rozdelenie detektorov, stacionárnych fáz a separačných módov. Boli popísané farmakologické a farmakodynamické vlastnosti vybraných liečiv ako aj postup validačných metód.

Experimentálna časť práce sa týka analýzy liečiv: Gabapentin, Levetiracetam, Primidon a Lamotrigin, kedy boli zaznamenané ich retenčné vlastnosti na SF Agilent Eclipse XDB-Phenyl 5 μm (4,6mm x 150mm), pri teplote 40 °C a prietoku MF pri 0,8 ml/min. Boli vyskúšané tri rôzne SF, ale ako najvhodnejšia kolóna bola práve vyššie zmienená SF Phenyl. Vytvorením vhodného gradientu bolo dosiahnuté skrátenie analýzy na celkový čas 9 minút, potom bolo prejdené na validáciu metódy v podobe linearity, precíznosti, presnosti, robustnosti. Pri overení zmeny rýchlosti prietoku bola vybraná 0,8 ml/min s ohľadom na problémy s tlakom na kolóne, pri zmene teploty bola zvolená teplota 40 °C, pri koncentrácii pufru to bola hodnota 10 mM a pomer zložiek fosfátového pufru 95:5 dihydrogenfosforečnan draselný: hydrogenfosforečnanu sodný.

V porovnaní s BP Martina Smolíka, ktorej chromatografické podmienky boli: SF Kinetex, pri teplote 35 °C a prietoku MF 0,8 ml/min, kedy celková dĺžka analýzy trvala kratšie ako v našej metóde a to 7,25 minút. Bolo v tejto DP dosiahnuté plánované rozlíšenie medzi píkmi analytov interného štandardu a primidonu a čiastočnej validácie, a tiež overením metódy na reálnych koncentráciách pohybujúcich sa v terapeutických hladinách, tak ako to bolo uvedené v cieľoch práce. Ďalšie skrátenie analýzy by bolo možné pri použití vyššieho prietoku MF, kedy pri prietoku 1,2 ml/min bolo rozlíšenie medzi jednotlivými analytmi stále dostačujúce.

Na záver práce bola analýzou reálnych vzoriek a izolátov plazmy z FN v Hradci Králové overená čiastočná funkčnosť vyvinutej metódy.

7 Zoznam citovanej literatúry a ďalších zdrojov

1. MILLIGAN, Tracey A. Epilepsy: A Clinical Overview. *The American Journal of Medicine* [online]. 2021, **134**(7), 840–847 [vid. 2023-03-25]. ISSN 00029343. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjmed.2021.01.038
2. PACK, Alison M. Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies: *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology* [online]. 2019, **25**(2), 306–321 [vid. 2023-03-25]. ISSN 1080-2371. Dostupné z: doi:10.1212/CON.0000000000000707
3. THIJIS, Roland D, Rainer SURGES, Terence J O'BRIEN a Josemir W SANDER. Epilepsy in adults. *The Lancet* [online]. 2019, **393**(10172), 689–701 [vid. 2023-09-03]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(18)32596-0
4. BEGHI, Ettore, Giorgia GIUSSANI a Josemir W. SANDER. The natural history and prognosis of epilepsy. *Epileptic Disorders* [online]. 2015, **17**(3), 243–253 [vid. 2023-09-03]. ISSN 1294-9361, 1950-6945. Dostupné z: doi:10.1684/epd.2015.0751
5. 1 High-performance liquid chromatography (HPLC): theoretical principles. In: Omar AL SAYED OMAR a Moustafa A. KHALIFA *High Performance Liquid Chromatography* [online]. B.m.: De Gruyter, 2022 [vid. 2023-03-22], s. 1–16. ISBN 978-3-11-052945-6. Dostupné z: doi:10.1515/9783110529456-001
6. NIELSEN, S. Suzanne. *Food analysis*. New York, NY: Springer Science+Business Media, 2017. 5. ISBN 978-3-319-45774-1.
7. MCMASTER, Marvin C. *HPLC, a practical user's guide*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007. ISBN 978-0-471-75401-5.
8. MOLDOVEANU, Serban C. a Victor DAVID. *Essentials in modern HPLC separations*. Second edition. Amsterdam: Elsevier, 2022. ISBN 978-0-323-91177-1.
9. MEYER, Veronika. *Practical high-performance liquid chromatography*. 4th ed. Chichester ; New York: John Wiley, 2004. ISBN 978-0-470-09377-1.

10. LUNDANES, Elsa, Léon REUBSAET a Tyge GREIBROKK. *Chromatography: basic principles, sample preparations and related methods*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014. ISBN 978-3-527-33620-3.
11. SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken, N.J: Wiley, 2010. ISBN 978-0-470-16754-0.
12. SWARTZ, Michael. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2010, **33**(9–12), 1130–1150 [vid. 2023-03-29]. ISSN 1082-6076, 1520-572X. Dostupné z: doi:10.1080/10826076.2010.484356
13. OHANNESIAN, Lena a Anthony J. STREETER, ed. *Handbook of pharmaceutical analysis*. New York: Marcel Dekker, 2002. Drugs and the pharmaceutical sciences, v. 117. ISBN 978-0-8247-0462-9.
14. DONG, M. W. *HPLC and UHPLC for practicing scientists*. Second edition. Hoboken, NJ: Wiley, 2019. ISBN 978-1-119-31379-3.
15. KAZAKEVICH, Yuri a Rosario LOBRUTTO, ed. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience, 2007. ISBN 978-0-471-68162-5.
16. *HPLC Practical Guide Merck* [online]. [vid. 2023-04-11]. Dostupné z: https://mz-at.de/fileadmin/user_upload/Brochures/merck_supelco_hplc-practical-guide.pdf
17. CORRADINI, Danilo. *Handbook of HPLC*. 2nd ed. Hoboken: CRC Press, 2010. ISBN 978-1-4200-1694-9.
18. WELLINGS, Donald A. *A practical handbook of preparative HPLC*. Amsterdam ; Boston: Elsevier, 2006. ISBN 978-1-85617-466-4.
19. KROMIDAS, Stavros, ed. *Optimization in HPLC: concepts and strategies*. Weinheim: Wiley-VCH, 2021. ISBN 978-3-527-34789-6.
20. AHUJA, Satinder, ed. *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. Amsterdam: Elsevier Acad. Press, 2005. Separation science and technology, 6. ISBN 978-0-12-088547-3.

21. KROMIDAS, Stavros, ed. *The HPLC expert: possibilities and limitations of modern high performance liquid chromatography*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2016. ISBN 978-3-527-67761-0.
22. <https://www.agilent.com/Library/datasheets/Public/820652-012c.pdf> [online]. [vid. 2023-04-11]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/Library/datasheets/Public/820652-012c.pdf>
23. *ACE_C18-PFP.pdf* [online]. [vid. 2023-08-05]. Dostupné z: http://www.hplc.sk/pdf/ACE/ACE_C18-PFP.pdf
24. *d2eccc5e-59d1-4763-b94c-665cc436faf4.pdf* [online]. [vid. 2023-08-19]. Dostupné z: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/d2eccc5e-59d1-4763-b94c-665cc436faf4.pdf>
25. *86e41712-6637-4a31-8182-23c0b2f5cf76.pdf* [online]. [vid. 2023-08-19]. Dostupné z: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/86e41712-6637-4a31-8182-23c0b2f5cf76.pdf>
26. ČR, Ministerstvo zdravotnictví. *Český lékopis 2017: Tištěná verze (1.-4. díl)*. B.m.: Grada Publishing a.s., 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
27. AHUJA, Satinder a Henrik RASMUSSEN. *HPLC method development for pharmaceuticals*. 1st ed. Amsterdam Boston: Elsevier, Academic Press, 2007. Separation science and technology, v. 8. ISBN 978-0-12-370540-2.
28. PUBCHEM. *Levetiracetam* [online]. [vid. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284583>
29. EMA. Keppra. *European Medicines Agency* [online]. 17. září 2018 [vid. 2023-04-11]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/keppra>
30. PUBCHEM. *Lamotrigine* [online]. [vid. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3878>
31. EMA. Lamictal. *European Medicines Agency* [online]. 17. září 2018 [vid. 2023-04-11]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/lamictal>

32. PUBCHEM. *Primidone* [online]. [vid. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4909>
33. S.R.O, Q. C. M. LISKANTIN, 250MG TBL NOB 100. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [vid. 2023-04-14]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0018489&tab=texts>
34. PUBCHEM. *Gabapentin* [online]. [vid. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3446>
35. S.R.O, Q. C. M. NEURONTIN, 600MG TBL FLM 60 I. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [vid. 2023-04-14]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0260353&tab=texts>
36. JOHANNESSEN LANDMARK, Cecilie, Svein I. JOHANNESSEN a Philip N. PATSALOS. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs: current status and future prospects. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* [online]. 2020, **16**(3), 227–238 [vid. 2023-08-22]. ISSN 1742-5255, 1744-7607. Dostupné z: [doi:10.1080/17425255.2020.1724956](https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1724956)
37. CALDERON, Leonardo, ed. *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis* [online]. B.m.: InTech, 2012 [vid. 2023-04-03]. ISBN 978-953-51-0813-9. Dostupné z: [doi:10.5772/2707](https://doi.org/10.5772/2707)
38. KATOCH, Rajan. *Analytical techniques in biochemistry and molecular biology*. New York: Springer, 2011. ISBN 978-1-4419-9784-5.
39. SMOLÍK, Martin. Analýza vybraných léčiv II. nedatováno.

