

STANOVENÍ LAMOTRIGINU V SÉRU POMOCÍ ON-LINE SPOJENÍ KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZY A KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZY

LUCIE BUDÁKOVÁ^{a,c}, HANA BROZMANOVÁ^a,
FRANTIŠEK KVASNIČKA^b a MILAN
GRUNDMANN^{a,c}

^a Ústav klinické farmakologie, Fakultní nemocnice Ostrava a Fakulta zdravotnických studií Ostravské Univerzity, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava, ^b Ústav konzervace potravin a technologie masa, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, ^c Farmakologický ústav lékařské fakulty Univerzity Palackého, Olomouc
lucie.budakova@fnspo.cz

Došlo 26.4.07, přepracováno 10.4.08, přijato 22.5.08.

Klíčová slova: lamotrigin, krevní sérum, elektromigrační metody, izotachoforéza, kapilární zónová elektroforéza

Úvod

Terapeutické monitorování léků (TDM) slouží ke kontrole účinků podaných léků a používá se hlavně tehdy, je-li měřitelnost účinku léku obtížná. Mezi monitorované léky patří především antiepileptika (AEP), které mají úzké terapeutické rozmezí a je u nich prokázána přímá závislost účinku na koncentraci v krvi^{1–3}. První AEP (fenobarbital, fenytoin) se objevila v klinické praxi v roce 1900. Stanovení jejich sérových koncentrací se stalo rutinní záležitostí okolo roku 1960 po zavedení vhodných analytických metod. U nás se začala AEP analyzovat později, zhruba od 80. let 20. století^{4–6}.

Během posledního desetiletí bylo uvedeno na trh několik nových AEP třetí generace, mezi něž patří i lamotrigin (LAM)⁷. LAM byl poprvé podán v Evropě v roce 1991 a v USA v roce 1994 (cit.⁸). LAM, 3,5-diamino-6-(2,3-dichlorofenyl)-1,2,4-triazin, je širokospektrální AEP, které se používá v monoterapii nebo v kombinacích s ostatními AEP. V době zavedení do klinické praxe se předpokládalo, že TDM nebude nutné, ale později se ukázalo, že LAM může ve vyšších koncentracích vyvolávat záchvaty podobně jako jiná AEP. Vzhledem k tomu, že některá AEP mohou ovlivňovat metabolismus LAM a snižovat jeho koncentraci v séru (např. fenytoin, karbamazepin, barbituráty) nebo naopak zvyšovat jeho koncentraci v séru (především kyselina valproová), je stanovení hladin jednotlivých AEP nutné a významně přispívá ke zlepšení léčby epilepsie⁹.

Na základě preklinických dat bylo navrženo terapeutické rozmezí 1–4 mg l⁻¹. Nicméně mnoho pacientů vyža-

duje na kompenzaci křečových stavů vyšší koncentrace. Nové terapeutické rozmezí 3–14 mg l⁻¹ navrhl Morris v roce 2000 na základě svých zkušeností s TDM epileptiků¹⁰.

Stanovení LAM v séru je popsáno různými autory. Nejvíce prací se týká chromatografických metod. Ke stanovení hladiny LAM byla použita metoda HPLC (cit.^{9,11–15}) i GC (cit.^{16–20}).

Z elektromigračních metod se ke stanovení LAM v biologických tekutinách použila micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)^{21,22}, kapilární elektrochromatografie (CEC)^{21–23} a kapilární zónová elektroforéza (CZE)²⁴.

V poslední době lze tedy sledovat nárůst publikací týkající se analýzy léků v biologickém materiálu, především v séru a moči^{21–36}. I když elektromigrační metody nacházejí uplatnění především v biochemii, v analýze životního prostředí a v analýze potravin, začínají se v poslední době používat i v TDM, to je v problematice, která ještě donedávna nebyla jejich typickou aplikační oblastí. Chromatografickým metodám mohou konkurovat rychlejší analýzou a jednodušší extrakcí vzorku při zachování stejné citlivosti.

Cílem práce bylo vypracovat podmínky pro separaci, identifikaci a kvantifikaci LAM v séru novou metodou on-line spojením kapilární izotachoforézy a kapilární zónové elektroforézy (ITP-CZE), validovat ji a výsledky reálných vzorků od pacientů porovnat s výsledky rutinně používané HPLC³⁷.

Experimentální část

Použité přístroje a zařízení pro ITP-CZE

Měření probíhalo na elektroforetickém analyzátoru EA 101 (Villa-Labeco, Spišská Nová Ves, SR) v dvoukolonovém uspořádání (předseparační teflonová kapilára 110 mm × 0,8 mm; analytická teflonová kapilára 90 × 0,3 mm) s UV detekcí při 254 nm. Použitý hnací proud byl v předseparační kapiláře 200 μA a v analytické 40 μA. Sběr dat a vyhodnocení výsledků bylo provedené počítačovým programem dodaným s analyzátozem EA 101. Analýzy se prováděly v kationtovém módu s přímým nástřikem vzorku (30 μl), při laboratorní teplotě a délka analýzy byla 20 min.

Chemikálie, roztoky a příprava elektrolytů

K přípravě elektrolytů a mobilní fáze byl použit acetonitril a methanol, (oba gradientové čistoty pro kapalínovou chromatografii, Merck, Darmstadt, Německo), voda Milli-Q kvality a voda pro HPLC, ε-aminokapronová kyselina, morfolinethansulfonová kyselina a triethylamin p.a (Aldrich, Buchs, Švýcarsko). Jako vnitřní standard při HPLC sloužila ethyl(*p*-tolyl)barbiturová kyselina (Aldrich, Buchs, Švýcarsko). Kyselina fosforečná p.a., dihydrofos-

forečnan sodný p.a. a diethylether byly výrobky Lachemy (Brno, ČR). Lamotrigin byl získán od firmy Glaxo Wellcome (Velká Británie). Sérum od neuzívajícího dárce bylo z transfúzního oddělení Fakultní nemocnice Ostrava (FNO) od zdravého dárce bez medikace. Séra pocházela od pacientů z neurologických oddělení a z neurologických ambulancí, která jsou rutinně měřena v Ústavu klinické farmakologie (ÚKF) FNO v rámci TDM antiepileptik

U ITP se používají dva základní elektrolyty, vedoucí (VE) a koncový (KE). VE u analýzy kationtů obsahuje kation s nejvyšší pohyblivostí z celé separované směsi, dále protiion opačného znaménka, který zajišťuje během analýzy definované pH. Naproti tomu koncový elektrolyt obsahuje ion, který má nižší pohyblivost než kterýkoliv ze separovaných iontů. Vzorek se vnáší mezi tyto dva elektrolyty. Po zapnutí stejnosměrného napětí se jednotlivé složky dělí podle svých pohyblivostí. CZE využívá separační kapiláru naplněnou základním elektrolytem, který má v celém systému stejné složení i koncentraci. Rozpuštěné složky disociují v závislosti na pH základního elektrolytu. Ionty jsou separované v důsledku rozdílných poměrů náboje ku hmotnosti. Nejprve migrují nejmenší kationty s největším nábojem, přičemž rychlost se snižuje se snižujícím se nábojem. Dále migrují neutrální látky a potom anionty s nejnižším nábojem, nakonec migrují malé a více nabitě anionty.

K přípravě elektrolytů se použila deionizovaná voda Milli-Q kvality. Vedoucí elektrolyt (VE) obsahoval 10 mM vodný roztok amoniaku, 20 mM morfolinethansulfonovou kyselinu a 10% vodný roztok methanolu; koncový elektrolyt (KE) pak 5 mM ε -aminokapronovou kyselinu, 5 mM morfolinethansulfonovou kyselinu a 15% vodný roztok methanolu a nosný elektrolyt 25 mM ε -aminokapronovou kyselinu, 25 mM morfolinethansulfonovou kyselinu, 0,1% (hydroxypropyl)methylcelulosu a 10% vodný roztok methanolu. (Hydroxypropyl)methylcelulosu jsme do elektrolytů přidali kvůli snížení náboje vnitřní stěny a zvýšení viskozity elektrolytu, což vede k zaostření rozhraní mezi zónami.

Příprava vzorků pro izotachoforetickou analýzu

K otestování vhodných podmínek pro analýzu ITP-ITP se vyzkoušely dvě přípravy vzorku. Prosté ředění séra s LAM (50 mg l^{-1}) nebo extrakce do diethyletheru. V prvním případě byl vzorek séra v množství 0,5 nebo 1 ml doplněn vodou Milli-Q kvality na 10 ml, ve druhém se provedla extrakce diethyletherem. K 200 μl séra s LAM (50 mg l^{-1}) se přidal 1 ml diethyletheru, obsah se míchal na laboratorním mixéru a centrifugoval po dobu 3 min při 4000 ot min^{-1} . Poté se odebrala horní etherová vrstva a ether se odpařil fénem. Odparek se rozpustil ve 200 μl vody a 20 μl se nadávkovalo mikrostříkačkou typu Hamilton do přístroje.

Pro systém ITP-CZE se vzorek připravoval ředěním. 100 μl séra s LAM (100 mg l^{-1}) se v odměrné baňce doplnilo na 10 ml deionizovanou vodou a vzorek se přímo

dávkoval do přístroje. Každý vzorek se analyzoval dvakrát.

Ze zásobního roztoku LAM v methanolu (o koncentraci 200 mg l^{-1}) se připravovaly vzorky pro validaci metody o různé koncentraci LAM tak, aby každý vzorek byl připraven v séru od neuzívajícího dárce. Linearita byla hodnocena 7 kalibračními body ($0,005\text{--}0,20 \text{ mg l}^{-1}$). Přesnost a správnost metody se zjistila opakovaným stanovením ($n = 6$) vzorku s třemi různými koncentracemi LAM ($0,01$; $0,07$ a $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ LAM v $100\times$ zředěném séru od neuzívajícího dárce), přičemž vzorky byly analyzovány v průběhu jednoho dne. U všech tří koncentrací se každý vzorek ($n = 6$) připravil úplným postupem.

Metoda kapalinové chromatografie

50 μl vzorku séra se pipetovalo do zkumavek s vnitřním standardem (ethyl-*p*-tolyl)barbiturová kyselina) a přidalo se 50 μl 1 mol l^{-1} hydrogenfosforečnanu sodného a 1 ml diethyletheru. Obsah zkumavek se míchal 30 s v laboratorním mixéru a zkumavky se centrifugovaly po dobu 3 min při 4000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci se odpipetovala horní etherová vrstva do zkumavek typu Eppendorf a ether se odpařil pod fénem. Odparek se rozpustil ve 200 μl vody pro HPLC a 20 μl methanolu a tím byl vzorek připraven pro chromatografickou analýzu. Každý vzorek se analyzoval dvakrát.

HPLC systém byl vybaven binární izokratickou pumpou P 1500, autosamplerem AS 1000 a detektorem UV 1000 s proměnlivou vlnovou délkou (Spectra System, USA). K vlastní analýze se použila chromatografická kolona SGX C18, $3 \times 150 \text{ mm}$ a velikost částic 5 μm (Tessek, Praha). Měření probíhalo při laboratorní teplotě, nastříkovaný objem byl 20 μl a doba analýzy 20 min. Mobilní fázi tvořila směs voda : acetonitril : methanol : triethylamin v poměru 72:23:5:0,1. Hodnota pH byla upravena 1 mol l^{-1} kyselinou fosforečnou na pH 7. Detekce se prováděla při 220 nm (cit.³⁷).

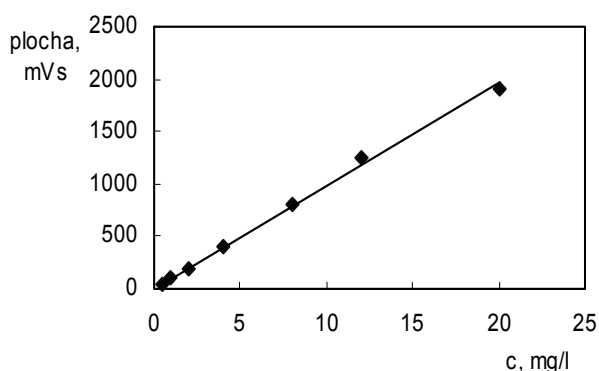
Výsledky a diskuse

Vývoj nové metody

Testovaly se vhodné podmínky pro stanovení LAM v séru metodou ITP-CZE s UV detekcí. Protože jde o bazické léčivo, měření probíhalo v kationtovém módu. Ověřovaly se jednak různé elektrolytové systémy a dvě elektromigrační metody (ITP-ITP a ITP-CZE). Ve spojení ITP-ITP s vodivostní a UV detekcí se používaly následující elektrolyty (VE 10 mM octan amonný, 10 mM octová kyselina, KE 5 mM octová kyselina). LAM se stanovil ve zředěném séru nebo se před analýzou extrahoval ze séra diethyletherem. Při analýze se ani v jednom systému neoděložil LAM od složek matrice (pravděpodobně u zředěného séra byla překročena i separační kapacita systému vlivem velkého množství sodíku).

Metoda ITP-CZE

Ze všech testovaných systémů byl prokazatelně nejlepší systém ITP-CZE s UV detekcí (254 nm) za použití následujících elektrolytů: VE (10 mM vodný roztok amoniaku, 20 mM morfolinethansulfonová kyselina, 10% vodný roztok methanolu); KE (5 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 5 mM morfolinethansulfonová kyselina, 15% vodný roztok methanolu) a nosného elektrolytu (25 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 25 mM morfolinethansulfonová kyselina, 0,1% (hydroxypropyl)methylcelulosa, 10% vodný roztok methanolu). U vzorku séra s LAM zředěného demineralizovanou vodou byl LAM dostatečně oddělen od složek matrice. Pro rutinní použití je důležité, aby se metoda vyznačovala snadnou a rychlou přípravou a malou spotřebou vzorku a chemikálií. 100 μ l séra bylo v odměrné baňce doplněno na 10 ml deionizovanou vodou. Výhodou této přípravy je, že lze ještě snížit spotřeba vzorku až na 10 μ l séra tím, že se vzorek připraví do 1 ml deionizované vody a dává se do přístroje mikrostříkačkou typu Hamilton.



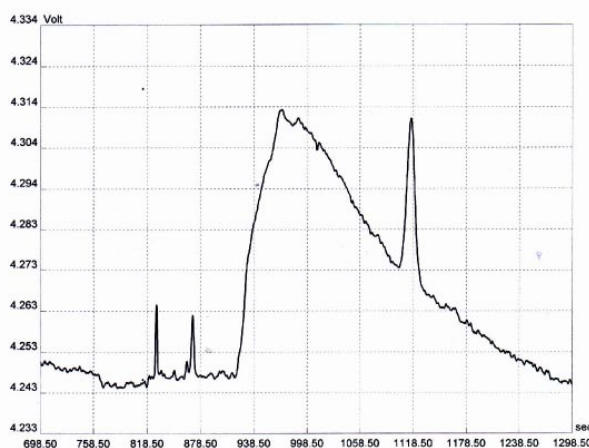
Obr. 1. Kalibrační křivka pro stanovení LAM v séru metodou ITP-CZE; VE 10 mM vodný amoniak, 20 mM morfolinethansulfonová kyselina, 10% methanol; KE 5 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 5 mM morfolinethansulfonová kyselina, 15% methanol a nosný elektrolyt 25 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 25 mM morfolinethansulfonová kyselina, 0,1% hydroxypropylmethylcelulosa, 10% methanol. Hnací proud v předseparační kapiláře 200 mA a v analytické 40 mA; vodivostní detekce

Tabulka I

Přesnost a správnost metody ITP-CZE (n = 6)

c(LAM) [mg l ⁻¹]	x	SD	VK [%]	R [%]
1	1,09	0,11	9,88	109,1
7	7,55	0,38	4,99	107,8
20	22,7	1,38	6,11	113,4

c – koncentrace v mg l⁻¹, x – průměr, SD – směrodatná odchylka, VK – variační koeficient, R – výtěžnost

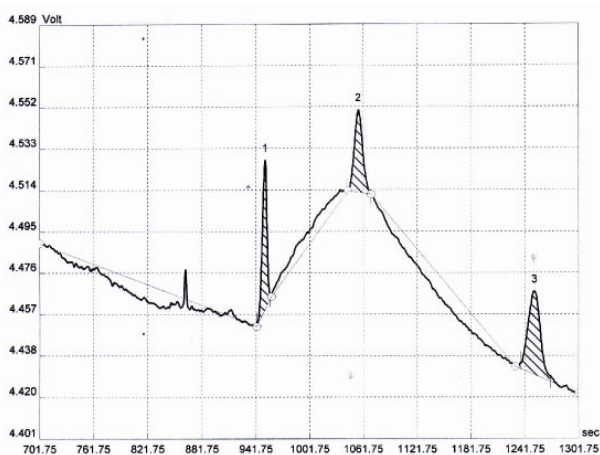


Obr. 2. Záznam analýzy séra od neuzivajícího dárce metodou ITP-CZE s UV detekcí (254 nm); píky ze séra na záznamu neinterferují stanovení LAM v séru. VE 10 mM vodný amoniak, 20 mM morfolinethansulfonová kyselina, 10% methanol; KE 5 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 5 mM morfolinethansulfonová kyselina, 15% methanol a nosný elektrolyt 25 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 25 mM morfolinethansulfonová kyselina, 0,1% hydroxypropylmethylcelulosa, 10% methanol. Hnací proud v předseparační kapiláře 200 mA a v analytické 40 mA; vodivostní detekce

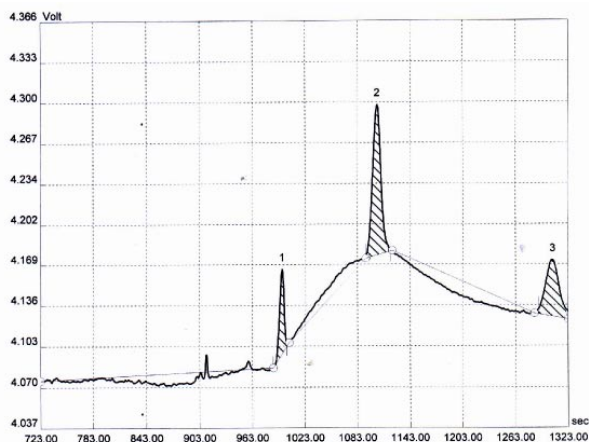
Validace metody ITP-CZE

Na základě sedmi bodové kalibrace bylo zjištěno, že koncentrační závislost je lineární v rozmezí 0–200 mg l⁻¹ (pro 100× zředěné sérum od neuzivajícího dárce to představuje 0–20 mg l⁻¹), což zahrnuje terapeutické rozmezí LAM (3–14 mg l⁻¹). Regresní rovnice kalibrační křivky je $y = 98,598x$, přičemž y představuje plochu píku v mVs a x koncentraci v mg l⁻¹. Hodnota korelačního koeficientu ($r = 0,998$) je blízká hodnotě 1, což potvrzuje dobrou linearitu kalibrační závislosti. Kalibrační křivka LAM je na obr. 1.

U výsledků se vyhodnocoval průměr (\bar{x}), směrodatná odchylka (SD), relativní směrodatná odchylka vyjádřená v % jako variační koeficient (VK), který charakterizuje přesnost metody. Hodnota VK nepřekročila 10 %. Správnost metody byla vyjádřena jako výtěžnost R (%). Hodnota výtěžnosti byla v rozmezí 80–120 %. V tabulce I je uveden \bar{x} , SD, VK a průměr R.

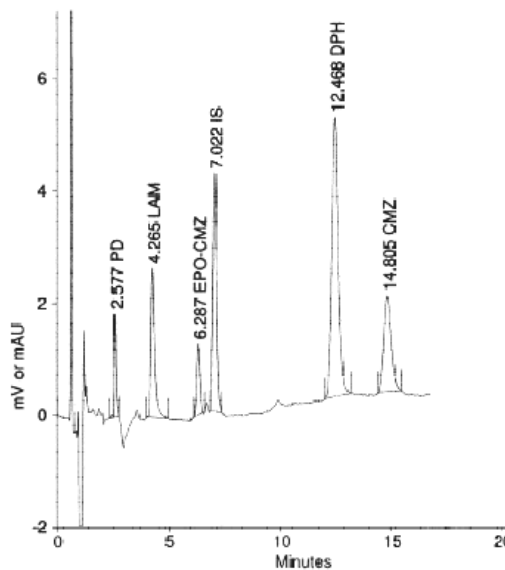


Obr. 3. Záznam analýzy séra metodou ITP-CZE s UV detekcí (254 nm); koncentrace LAM v séru $4,1 \text{ mg l}^{-1}$ (pík č. 2). VE 10 mM vodný amoniak, 20 mM morfolinethansulfonová kyselina, 10% methanol; KE 5 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 5 mM morfolinethansulfonová kyselina, 15% methanol a nosný elektrolyt 25 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 25 mM morfolinethansulfonová kyselina, 0,1% hydroxypropylmethylcelulóza, 10% methanol. Hnací proud v předseparační kapiláře $200 \mu\text{A}$ a v analytické $40 \mu\text{A}$; vodivostní detekce

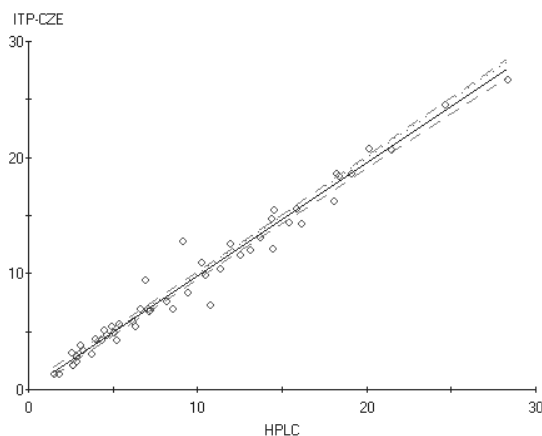


Obr. 4. Záznam analýzy séra metodou ITP-CZE s UV detekcí (254 nm); koncentrace LAM v séru $12,2 \text{ mg l}^{-1}$ (pík č. 2). VE 10 mM vodný amoniak, 20 mM morfolinethansulfonová kyselina, 10% methanol; KE 5 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 5 mM morfolinethansulfonová kyselina, 15% methanol a nosný elektrolyt 25 mM ϵ -aminokapronová kyselina, 25 mM morfolinethansulfonová kyselina, 0,1% hydroxypropylmethylcelulóza, 10% methanol. Hnací proud v předseparační kapiláře $200 \mu\text{A}$ a v analytické $40 \mu\text{A}$; vodivostní detekce

Limit detekce (LOD) byl na základě proměření nulové linie vypočten pomocí trojnásobné výšky šumu a z kalibrační křivky byla odečtena odpovídající koncent-



Obr. 5. Záznam analýzy séra s LAM ($5,1 \text{ mg l}^{-1}$) metodou HPLC s UV detekcí (220 nm); kolona Separon SGX C 18, 5 mm, ($3 \times 150 \text{ mm}$); UV detekce při 220 nm; mobilní fáze: acetonitril:metanol:voda:TEA 23:5:72:0,1 (v/v/v), pH 7,0; průtok mobilní fáze 1 ml min^{-1}



Obr. 6. Grafické znázornění korelace dvou metod (HPLC a ITP-CZE) podle regresní analýzy podle Passinga a Babloka

race. Limit kvantifikace (LOQ) byl vypočten pomocí desetinásobné výšky šumu. Hodnoty LOD a LOQ jsou $0,25$ a $0,83 \text{ mg l}^{-1}$.

Na obr. 2 je izotachoforeogram vzorku séra od neužívajícího dárce. Ze záznamu je zřejmé, že za daných pracovních podmínek neruší žádné jiné složky ze séra, což potvrzuje selektivitu metody.

Na obr. 3 a 4 jsou uvedeny izotachoforeogramy reálných vzorků (LAM 4,1 mg l⁻¹ a LAM 12,2 mg l⁻¹) a na obr. 5 je chromatogram séra s LAM o koncentraci 5,1 mg l⁻¹.

Srovnání metody ITP-CZE s metodou HPLC

Novou ITP-CZE metodou se proměřilo 50 reálných vzorků a výsledky se srovnaly s těmi, které byly získány rutinní HPLC metodou. Regresní analýza podle Passinga a Babloka ukázala, že 95% interval spolehlivosti pro směrnici se pohyboval v rozmezí 0,89–1,03, což potvrzuje, že odchylka směrnice od 1 je statisticky nevýznamná a 95% interval spolehlivosti pro úsek na ose Y byl –1,73 až +4,25, což potvrzuje, že úsek na ose Y je statisticky nevýznamný. Obě metody tedy poskytují v rámci zvolené pravděpodobnosti (95% hladina významnosti) shodné výsledky. Výsledný graf je na obr. 6.

Závěr

Cílem práce bylo zavést a validovat novou elektromiografickou metodu na stanovení LAM v séru, pro její případné rutinní použití v rámci TDM v ÚKF FNO. Po otestování systémů ITP-ITP a ITP-CZE a několika různých elektrolytů byla jako nejlepší vybrána metoda ITP-CZE s UV detekcí při 254 nm. Ve srovnání s HPLC je příprava vzorku u metody ITP-CZE jednodušší a rychlejší. Potřebné množství séra k analýze se dá snížit až na 10 µl, což je velmi významné zvláště pro TDM u dětí. Obě metody jsou přibližně stejně časově náročné. Výhodou ITP-CZE jsou výrazně nižší provozní náklady na analýzu ve srovnání s HPLC.

Metoda ITP-CZE vyhovuje všem validačním požadavkům, jako je přesnost, správnost, linearita a selektivita a má přijatelné LOD a LOQ. Metoda byla srovnána s původní HPLC metodou pomocí regresní analýzy podle Passinga a Babloka na základě proměření 50 reálných vzorků a zjistilo se, že mezi výsledky obou metod neexistuje statisticky významný rozdíl.

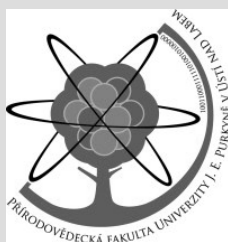
LITERATURA

- Gross A. S.: Br. J. Clin. Pharmacol. 46, 95 (1998).
- Johanessen S. I.: CNS Drugs. 7, 349 (1997).
- Eadie M. J.: Br. J. Clin. Pharmacol. 46, 185 (1998).
- Tomson T., Johanessen S. I.: Eur. J. Clin. Pharmacol. 55, 697 (2000).
- Buchthal F., Svendsmark O.: Epilepsia 1, 373 (1960).
- Grundmann M., Brozmanová H., Bobčíková P.: Ther. Drug Monit. 21, 451 (1999).
- Tomson T., Johanessen S. I.: Eur. J. Clin. Pharmacol. 55, 697 (2000).
- Leach M. J., Lees G., Riddall D. R., v knize Levy R. H., Mattson R. H., Meldrum B. S. (ed.): *Antiepileptic Drugs*, 4. vydání, str. 861. Raven, New York 1995.
- Tsiropoulos I., Kristensen O., Klitgaard N. A.: Ther. Drug Monit. 22, 517 (2000).
- Morris R. G., Black A. B., Lam E., Westley I. S.: Ther. Drug Monit. 22, 656 (2000).
- Vidal E.: J. Chromatogr., B 736, 295 (1999).
- Beck O., Ohman I., Nordgren H. K.: Ther. Drug Monit. 28, 603 (2006).
- Cheng C. L., Chou C. H., Hu O. Y.: J. Chromatogr., B 817, 199 (2005).
- Croci D., Salmaggi A., Grazia U., Bernardi G.: Ther. Drug Monit. 23, 665 (2001).
- Matar K. M., Nicholls P. J., Bawazir S. A., Hassan M. I., Tekle A. J.: Pharm. Biomed. Anal. 17, 525 (1998).
- Watelle M., Demedts P., Franck F., Degn P. P., Wauters A., Neels H.: Ther. Drug Monit. 19, 460 (1997).
- Queiroz M. E., Silva S. M., Carvalho D., Lancas F. M.: J. Chromatogr. Sci. 40, 219 (2002).
- Wyszomirska E., Czerwinska K.: Acta Pol. Pharm. 56, 101 (1999).
- Hallbach J., Vogel H., Guder W. G.: Eur. J. Clin. Chem. Biochem. 35, 755 (1997).
- Dasgupta A., Hart A. P.: J. Chromatogr., B 23, 101 (1997).
- Lancas F. M., Sozza M. A., Queiroz M. E. C.: J. Anal. Toxicol. 27, 304 (2003).
- Kuldvee R., Thormann W.: Electrophoresis 22, 1345 (2001).
- Ivanova M., Piunti A., Marziali E., Komarova N., Raggi M. A., Kenndler E.: Electrophoresis 24, 992 (2003).
- Shihabi Z. K., Oles K. S.: J. Chromatogr., B 683, 119 (1996).
- Hartinger C. G., Schluga P., Galanski M.: Electrophoresis 24, 2038 (2003).
- Belin G. K., Krähenbühl S., Hauser P. C.: J. Chromatogr., B 847, 205 (2007).
- Lloyd D. K.: J. Chromatogr., A 735, 29 (1996).
- Theurillat R., Kuhn M., Thormann W.: J. Chromatogr., A 979, 353 (2002).
- Zinellu A., Carru C., Sotgia S.: Eur. J. Pharm. Sci. 24, 375 (2005).
- Siren H., Kuldvee R., Karla T., Ekstrom T., Riekkola M. L.: J. Chromatogr., A 1068, 89 (2005).
- Lai E. P. C., Feng S. Y.: J. Chromatogr., B 843, 94 (2006).
- Pacáková V., Coufal P., Štulík K., Gaš B.: Electrophoresis 24, 1883 (2003).
- Schmutz A., Thormann W.: Ther. Drug Monit. 15, 310 (1993).
- Caslavska J., Lienhard S., Thormann W.: J. Chromatogr. 638, 335 (1993).
- Ivanova M., Piunti A., Marziali E., Komarova N., Raggi M. A., Klendler E.: Electrophoresis 24, 992 (2003).
- Ölvecká E., Koníková M., Grobuschek N., Kaniánsky D., Stanislawski B.: J. Sep. Sci. 26, 693 (2003).
- Budáková L., Brozmanová H., Grundmann M., Fischer J.: J. Sep. Sci. 31, 1 (2008).

L. Budáková^{a,c}, H. Brozmanová^a, F. Kvasnička^b, and M. Grundmann^{a,c} (^a *Department of Clinical Pharmacology, University Hospital Ostrava and Faculty of Health Studies, University of Ostrava, Ostrava*, ^b *Department of Food Preservation and Meat Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*, ^c *Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc*): **Determination of Lamotrigine by Isotachopheresis – Capillary Zone Electrophoresis**

The aim of this work was to develop and validate electrophoretic methods for the determination of a new antiepileptic, lamotrigine (LAM). We tested the conditions for analysis of LAM in blood serum by two capillary isota-

chophoreses (ITP-ITP) and by capillary isotachopheresis – capillary zone electrophoresis (ITP-CZE). Best results were obtained using the ITP-CZE method with UV detection at 254 nm. The latter method offers a simple and rapid procedure for the determination of LAM in blood serum. A low sample volume is highly convenient especially for the determination in children. The analysis takes some 20 min. The linearity of the method was proved in the range 0–20 mg LAM/l. The limits of detection and quantification were 0.25 and 0.83 mg LAM/l, respectively. The variation coefficients were below 10 % at three concentration levels (1, 7 and 20 mg l⁻¹). The method was compared with HPLC using the Passing-Bablok regression analysis; no significant differences were found.



Katedra chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem nabízí následující studijní obory:

- Bc. (délka studia 3 roky): Toxikologie a analýza škodlivin
- Bc. (3): Stavební chemie
- Bc. (3): Chemie pro dvouoborové studium
- Bc. (3): Chemie pro dvouoborové studium se zaměřením na vzdělávání
- NMgr. (2): Učitelství chemie pro 2. stupeň ZŠ

Více informací o katedře: www.sci.ujep.cz/chemistry