

Institut für Klinische Pharmakologie, Medizinische Fakultät der TU Dresden, Germany

Eine schnelle und empfindliche HPLC-Methode zur Bestimmung von Lamotrigin im Serum

R. OERTEL, K. RICHTER, und U. EBERT

Lamotrigin (3,5-Diamino-6-(2,3-dichlorophenyl)-1,2,4-triazin) ist ein bei Patienten mit fokalen und generalisierten Anfällen häufig angewandetes Antikonvulsivum. Für eine pharmakokinetische/pharmakodynamische Studie wurden einmalig 25 mg Lamotrigin oral gleichzeitig mit Cimetidin bzw. Rifampicin gegeben. Verschiedene Methoden zur Bestimmung von Lamotrigin im Serum sind in der Literatur

beschrieben [1–4]. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, eine schnelle, einfache, automatisierbare, empfindliche Methode zu entwickeln, mit der es möglich ist, sowohl sehr niedrige Lamotriginkonzentrationen wie in dieser Studie, als auch wesentlich höhere Konzentrationen wie beim Drug monitoring im Serum von Patienten oder im Urin zu bestimmen.

Eine neuentwickelte Probenvorbereitung erfolgte mit einem Automaten für die Festphasenextraktion ASPEC XL mit C8 endcapped Kartuschen. Das Probevolumen betrug 0,2 ml Serum. Die Eluate wurden getrocknet, danach in Laufmittel gelöst, überführt und auf die analytische Säule (SuperspherRP18 endcapped) injiziert. Für die Messung von Lamotrigin wurde ein UV-Detektor ($\lambda = 280 \text{ nm}$) eingesetzt.

Die automatische Festphasenextraktion dauerte 12 min für jede Probe und erfolgte bei größeren Serien über Nacht. Die Retentionszeit von Lamotrigin betrug 2,4 min. Für die Analyse einer Probe wurden 6 min benötigt. Ein interner Standard war nicht erforderlich. Vom Hersteller werden die Extraktionskartuschen als Einwegmaterial angeboten, bei kleinen Probemengen wie 0,2 ml Serum war es problemlos möglich, die Kartuschen mindestens zehnmal wiederzuverwenden.

Die Systempräzision wurde durch zehnmalige Einspritzung einer Probe bestimmt. Der gefundene Variationskoeffizient der Peakhöhen von Lamotrigin beträgt 1,2%. Die Bestimmung von sechs unabhängigen Standardkurven im Bereich von 0,05 bis 2 $\mu\text{g/ml}$ ergibt für Lamotrigin eine lineare Abhängigkeit der Peakhöhen mit Korrelationskoeffizienten von 0,9927 bis 0,9997. Die Richtigkeit, als Differenz zwischen Einsatz und Wiederfindung, liegt zwischen 97,3% bei 0,05 $\mu\text{g/ml}$ und 103,4% bei 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Die Standardabweichung der Mittelwerte der Bestimmungen liegt im gesamten Bereich unter 10%. Die untere Quantifizierungsgrenze beträgt 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Weniger als 2% der Meßwerte lagen unterhalb dieser Konzentration. Die Methode ist spezifisch, Interferenzen mit Peaks von Cimetidin, Rifampicin oder Fremdstoffen wurden nicht beobachtet. Chromatogramme von einem Serumleerwert und von einer Probe eines Probanden sind in der Abbildung dargestellt. Für die Messung höherer Lamotriginkonzentrationen wurden nur 0,1 ml Probevolumen eingesetzt und bzw. oder das getrocknete Eluat in mehr Laufmittel aufgenommen.

Experimenteller Teil

1. Ausführung der Methode

Jeweils 0,2 ml der aufgetauten und gründlich gemischten Serumproben werden in ASPEC-Probegefäße gegeben, dazu kommt 0,1 ml Puffer pH 8. Nach dem Schütteln (10 s) mit einem Heidolph-Mixer werden die Gefäße in den Automaten für die Festphasenextraktion ASPEC XL Sample Processor (Gilson, Middleton, WI, USA) gestellt. Zum Einsatz kamen Isolute C8 (ec) 100 mg/1 ml cartridges (IST, Mid Glamorgan, UK)

Konditionieren: 0,5 ml Methanol in 30 s, 0,5 ml Luft in 5 s, 1 ml Wasser in 1 min;

Laden: 0,3 ml Probe (0,2 ml Serum + 0,1 ml Puffer pH 8) in 36 s, 2 ml Luft in 20 s;

Waschen: 1 ml Wasser + 10% Methanol in 1 min, 2 ml Luft in 20 s;

Elution: 0,4 ml Methanol in 30 s, 1,2 ml Luft in 12 s.

Das Lösungsmittel wird bei 70 °C im Luftstrom in einem Techne DRI Block SC-3 (thermo-DUX, Wertheim, Germany) bis zur Trockne abgedampft. Der Rückstand wird in 100 μl Laufmittel gelöst und mit einer Eppendorf-Pipette in ein konisches Probengefäß des Autosamplers überführt. Von jeder Probe werden 50 μl vom Autosampler zur Bestimmung aus den Probengefäßen entnommen und eingespritzt.

2. HPLC-Bedingungen

Autosampler Gynkotec GINA 50T; Pumpe: Gynkotec P580; UV-Detektor: Shimadzu SPD 10A, Messung bei 280 nm; Systemsteuerung, Datenerfassung

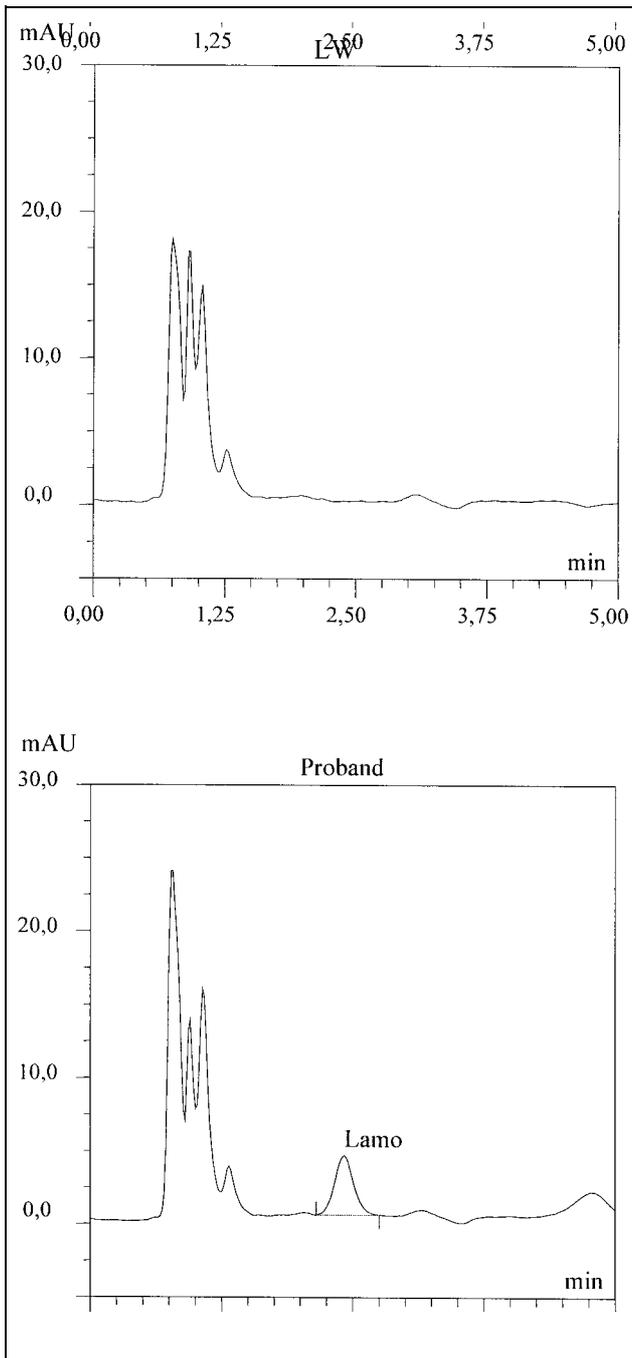


Abb.: Typische Chromatogramme: oben Serumleerwert; unten Probandenserum (Konzentration 0,33 $\mu\text{g/ml}$)

und -auswertung mit Chromeleon 4.2 (Dionex); Säule: 5 μm Partikelgröße, 125 mm \times 4 mm i. D., Edelstahl-Kartusche LiChroCART; Superspher 100 RP-18 endcapped, Merck 16855; Elutionsmittel: Acetonitril/Kaliumdihydrogenphosphat, 0,02 mol/l + 0,5 ml Phosphorsäure (pH 4) (20/80 v/v); Flußrate: 1,8 ml/min (Druck 180 bar); Säulenofen Gynkotec STH 585; Temperatur: 40 °C; Laufzeit einer Analyse: 6 min.

3. Verwendete Substanzen und Lösungsmittel

Lamotrigin Fa. Wellcome. Acetonitril LiChrosolv für die Chromatographie, Merck. Methanol LiChrosolv für die Chromatographie, Merck. Reinstwasser, 0,05 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 0,2 μm Filter, SG Klein-Reinstwassersystem RS 40 E. Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse, MERCK.

4. Auswertung der Chromatogramme

Die Daten auf den Chromatogrammen wurden auf Plausibilität und auf die richtige Peakzuordnung überprüft. Die Auswertung erfolgte über die Peakhöhen von Lamotrigin mit den Programmen Chromeleon 4.2 (dionex) und Excel 7.0 (Microsoft). Die Regressionsgeraden werden mit einer Wichtung $1/\times$ berechnet.

Die Retentionszeit für Lamotrigin beträgt 2,4 min.

Literatur

- 1 Lensmeyer, G. L.; Gidal, B. E.; Wiebe, D. A.: *Ther. Drug Monit.* **19**, 292 (1997)
- 2 Matar, K. M.; Nicholls, P. J.; Bawazir, S. A.; al Hassan, M. I.; Tekle, A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 525 (1998)
- 3 Ren, S.; Scheuer, M. L.; Zheng, W.: *Ther. Drug Monit.* **20**, 209 (1998)
- 4 Sinz, M. W.; Rimmel, R. P.: *J. Chromatogr.* **571**, 217 (1991)

Eingegangen am 12. Februar 1999
Angenommen am 1. April 1999

Dr. Reinhard Oertel
Institut für Klinische Pharmakologie
Fiedlerstr. 27
D-01307 Dresden
reioer@rcs.urz.tu-dresden.de

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, J. A. Comenius University, Bratislava, Slovak Republic

Thermodynamic study of the local anaesthetic heptacaine

Study of local anaesthetics, part: 149*

F. ANDRIAMAINTY and J. ČIŽMÁRIK

Heptacaine, the hydrochloride of the piperidinoethylester of 2-heptyloxyphenylcarbamic acid [1, 2], is a local anaesthetic. Herein, a basic thermodynamic study of this drug is presented.

The Fig. shows the dependence of the electromotoric force E (mV) upon the heptacaine concentration c ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) ($E = E_0 + (kRT/F) \log(C^A)$) in saline solution (E : electromotoric force, R : gas constant, T : absolute temperature, C^A : total heptacaine concentration in a sample). We can divide the dependence of E upon $\log c$ to three parts: a linear loss of E (mV) from the concentration corresponding $\log c = 3.27 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, then a more significant loss of E follows to $C = 7 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ corresponding c.m.c.

The equation $\text{c.m.c.} = f(T)$ represents the dependence of the critical micellar heptacaine concentration (c.m.c.) upon temperature at $\text{pH} \approx 4.5-5$, for example at $T = 298.15 \text{ K}$ (c.m.c. $\approx 0.0070 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), $T = 301.15 \text{ K}$ (c.m.c. $\approx 0.0074 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), $T = 309.15 \text{ K}$ (c.m.c. $\approx 0.0077 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), $T = 314.15 \text{ K}$ (c.m.c. $\approx 0.0082 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), $T = 318.15 \text{ K}$ (c.m.c. $\approx 0.0087 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Based on this dependence, the thermodynamic magnitudes were calculated ($-\Delta G^\circ$, $-\Delta H^\circ$, $-\Delta S^\circ$) according the model "action masse" [3]. Gibbs energy change can be estimated according the equation;

$$\Delta G^\circ = (2 - \beta) RT \ln(\text{c.m.c.})$$

where β = anti-ions level and calculated according to [4] ($\beta = 0.59$), R = gas constant and T = absolute tempera-

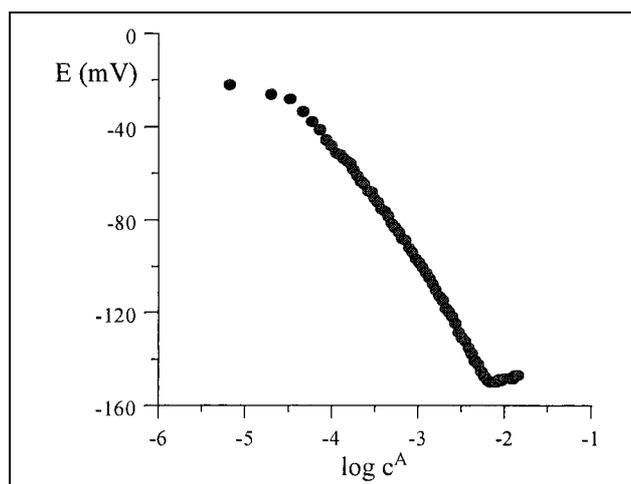


Fig.: Dependence of the electromotoric force E [mV] upon the heptacaine concentration ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl solution at 25°C

Table: Free energy ΔG° , enthalpy ΔH° , entropy ΔS° of heptacaine micellization in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl at various temperatures

| T (K) | ΔG° ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) | ΔH° ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) | $T\Delta S^\circ$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) |
|--------|--|--|---|
| 298.15 | -17.3 ± 2.3 | -11.2 ± 1.1 | 6.2 ± 3.5 |
| 301.15 | -17.4 ± 2.4 | -11.4 ± 1.2 | 5.9 ± 3.5 |
| 309.15 | -17.5 ± 2.5 | -12.1 ± 1.2 | 5.5 ± 3.7 |
| 314.15 | -17.6 ± 2.5 | -12.4 ± 1.3 | 5.2 ± 3.8 |