



Desarrollo y Validación de un Método por HPLC para la Determinación de Carbamacepina en Plasma Humano

María G. VOLONTÉ*, María A. VIÑAS, Carolina E. GORRITI, María C. ESCALES,
Laura A. SÁNCHEZ & M. Esperanza RUIZ

*Cátedra Control de Calidad de Medicamentos, Área Farmacia, Departamento de Ciencias Biológicas,
Facultad Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata,
Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina.*

RESUMEN. Se desarrolló y validó un método rápido y simple por HPLC para la determinación de carbamacepina en plasma humano. Las condiciones cromatográficas fueron: columna C-18, fase móvil acetonitrilo:metanol:acetato de amonio 0,05 M (30:10:60), flujo 1,2 ml/min y detección a 230 nm. Se utilizó nitraxepan como estándar interno. El método fue exitosamente aplicado a la determinación de los parámetros farmacocinéticos de carbamacepina en un voluntario sano. Durante la validación se evaluó linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y especificidad del método. La respuesta resultó lineal en el intervalo de concentraciones 0,075–3,00 µg/ml. La precisión fue menor del 5,0% expresada como coeficiente de variación. La exactitud fue del 83–99% y el límite de cuantificación fue de 0,075 µg/ml. Se demostró la especificidad del método respecto a la matriz biológica y a cafeína. La droga resultó estable en la matriz bajo las condiciones ensayadas. El método puede ser aplicado en estudios clínicos con voluntarios humanos sanos, como estudios farmacocinéticos o de bioequivalencia.

SUMMARY. "Development and Validation of an HPLC Method for Determination of Carbamazepine in Human Plasma". A rapid and simple HPLC method for determination of carbamazepine in human plasma was developed and validated. The chromatographic conditions were: C-18 column, acetonitrile/methanol/ammonium acetate 0,05 M (30/10/60) as mobile phase; flow rate 1,2 ml/min and 230 nm detection. Plasma samples were spiked with an internal standard (nitraxepan). The method was successfully applied to determine pharmacokinetics parameters in a healthy volunteer. The method was validated with respect to linearity, precision, accuracy, limit of quantification, selectivity, specificity and stability. The response was linear for the drug concentration range from 0,075 up to 3,00 µg/ml. The RSD values for precision studies were less than 5,0%. The recovery of the drug ranged between 83–99% and the limit of quantification 0,075 µg/ml. The method was specific in relation to biological matrix and to caffeine. The drug was stable in the matrix under the studied conditions. The method can be used in clinical trials with healthy human volunteers, like bioequivalence or pharmacokinetic studies.

INTRODUCCIÓN

Carbamacepina (CBZ) es una droga de estrecho margen terapéutico ¹, perteneciente al grupo de las benzoazepinas, (5H-dibenz[b,f]azepina-5-carboxamida), ampliamente utilizada para el tratamiento de convulsiones tónico-clónicas y convulsiones parciales complejas, tanto en niños como en adultos ².

Por tratarse de una droga de estrecho margen terapéutico, pequeñas fluctuaciones en la velocidad de absorción y/o cantidad absorbida,

pueden resultar tanto en toxicidad como en pérdida de efecto, y por lo tanto del control de las convulsiones. Resulta imprescindible entonces minimizar la variabilidad en el proceso de absorción de drogas como CBZ. Sin embargo, las formas farmacéuticas convencionales de liberación inmediata de CBZ suelen requerir administración frecuente, y existen reportes de variabilidad considerable en los niveles sanguíneos de la droga ³. Por otro lado, la CBZ es una droga capaz de autoinducir su metabolismo hepático

PALABRAS CLAVE: Carbamacepina. Cromatografía líquida de alta resolución. Plasma humano. Validación.

KEY WORDS: Carbamazepine. High performance liquid chromatography. Human plasma. Validation.

*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. *E-mail:* kv@biol.unlp.edu.ar

en aproximadamente un período de dos semanas. Todos estos factores tienen un impacto negativo en la biodisponibilidad y bioequivalencia de CBZ ⁴⁻⁷.

Si bien existen en la bibliografía varios métodos por HPLC para la determinación de CBZ en plasma humano, muchos de ellos requieren largos procesos de extracción, tanto en fase sólida ^{8,9} como en fase líquida ^{10,11}. Por otro lado se encuentran métodos cuyo proceso de preparación de la muestra resulta simple pero que luego requieren condiciones cromatográficas complicadas, como altas temperaturas, fase móvil compleja o equipamiento específico y/o costoso ^{8,11-13}.

En el presente trabajo, se desarrolla y valida un método simple, rápido y económico para la determinación de CBZ en plasma humano, el cual tiene aplicación directa en estudios farmacocinéticos y de bioequivalencia, en los cuales se deben procesar y analizar simultáneamente un gran número de muestras. El método aquí presentado sólo requiere una etapa de desproteización que se realiza en un único paso, y equipamiento básico de HPLC operado en condiciones isocráticas. Cuenta además con la ventaja de que los tiempos de retención son cortos.

En estudios de biodisponibilidad es esencial usar métodos analíticos bien caracterizados y completamente validados, de manera de obtener resultados confiables que puedan ser interpretados satisfactoriamente. Es por esto que en el presente trabajo se han seguido las guías de la Food and Drug Administration (FDA), así como las recomendaciones de expertos en el tema, los cuales brindan criterios generales para la validación de métodos bioanalíticos ^{14,15}.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipamiento

Se utilizó un cromatógrafo Gilson, equipado con un sistema de bombeo modelo 322-H2, un detector UV-Visible modelo 156, una unidad de interfase modelo 506C y una estación de trabajo operada con el software UniPoint LC versión 3.3 (Gilson SAS, Villiers-Le-Bel, Francia). El inyector manual es un modelo 7725 con loop fijo de 20 μ l (Rheodyne, CA, USA). Se trabajó en fase reversa, con una columna Lichrocart C-18, de 250 mm x 4 mm d.i. y tamaño de partícula de 5 μ m (Merck, Darmstadt, Alemania). Para la preparación de las muestras se utilizaron micropipetas Eppendorf de 100-1000 y 5000 μ l. Todas las pesadas se realizaron en una balanza Metler Tole-do AG 204 (Metler, Greifensee, Suiza).

Materiales

Las sustancias de referencia Carbamacepina (CBZ), Nitrazepam (NTZ), utilizado como estándar interno, SI y Cafeína (CF) fueron donadas por el Laboratorio de Control de Calidad del Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires. Los solventes utilizados, acetonitrilo, metanol y agua, fueron grado HPLC y el acetato de amonio, grado analítico. (J.T. Baker, Phillisburg, USA). La fase móvil y las muestras fueron filtradas a través de membranas Millipore tipo HV, de tamaño de poro 0,45 μ m (Millipore, Bedford, MA, USA).

Condiciones Cromatográficas

La fase móvil empleada consistió en una mezcla de acetonitrilo, metanol y acetato de amonio (0,05 M), (30:10:60), previamente filtrada y desgasificada. Se trabajó en forma isocrática a temperatura ambiente (23-25 °C), con un flujo de fase móvil de 1,2 ml/min, con detección a 230 nm y utilizando altura de pico (AP) como parámetro de integración. Las inyecciones se realizaron en forma manual y el volumen de las mismas fue de 20 μ l.

Preparación de las soluciones estándar

Las soluciones stock de los estándares fueron preparadas en acetonitrilo, con una concentración final de 0,5 mg/ml para CBZ y 1,2 mg/ml para NTZ. Todas las diluciones posteriores de estas soluciones también fueron realizadas en acetonitrilo. De la solución stock de CBZ se obtuvieron diluciones de concentración 7,5; 15; 75; 150 y 300 μ g/ml y de la de NTZ de 50 μ g/ml.

Las soluciones estándar utilizadas para determinar la linealidad del método se prepararon agregando 50 μ l de cada una de las diluciones de CBZ y 170 μ l de la dilución de NTZ a plasma humano libre de droga previamente desproteizado (1,5 ml de acetonitrilo por cada ml de plasma), hasta un volumen final constante de 5 ml.

En el caso del ensayo de exactitud, se procedió de forma similar a la indicada en el párrafo anterior, excepto que la etapa de desproteización se realizó *luego* de mezclar las diluciones de las soluciones estándar con el plasma humano libre de droga.

Preparación de las muestras

El volumen inicial de muestra fue de 1,0 ml (plasma en estudio conteniendo CBZ), sobre el que se adicionaron 85 μ l de solución de NTZ (50 μ g/ml) y se agitó en vórtex durante 2 min.

Se midieron 0,5 ml de esa mezcla y se agregaron lentamente sobre 0,75 ml de acetonitrilo para su desproteínización, luego de lo cual se sonicó 5 min y se centrifugó durante 10 min a 1500 g. El sobrenadante fue filtrado y transferido a un vial para su posterior inyección en el sistema HPLC.

Validación del método

La linealidad del método fue evaluada utilizando una curva de calibración obtenida con cinco niveles de concentración de CBZ estándar en plasma humano libre de droga, previamente desproteínizado. Dichas soluciones fueron preparadas como se indicó anteriormente. Las concentraciones finales fueron 0,075; 0,15; 0,75; 1,5 y 3,0 µg/ml para CBZ, y 1,7 µg/ml para NTZ. Mediante un análisis de regresión se determinó el coeficiente de determinación, la pendiente y la ordenada de dicha curva. Para confirmar el ajuste de la misma al modelo lineal se realizó un análisis del factor respuesta (relación entre la señal y la concentración), un análisis de residuales y el test de Student.

El límite de cuantificación (LC) se define como la menor concentración de CBZ en una muestra susceptible de ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones experimentales descriptas. Para ello se utilizaron las recomendaciones de la FDA¹⁴, que indican que la menor concentración de la curva de calibración puede ser aceptada como LC.

La precisión del sistema se calculó como el coeficiente de variación (CV) de cinco inyecciones de una misma solución estándar de CBZ en plasma humano libre de droga, a dos niveles de concentración, 0,15 y 2,00 µg/ml. La repetibilidad o precisión del método se calculó como el CV obtenido a partir de la inyección de cinco muestras independientes de CBZ en plasma humano libre de droga, a tres niveles de concentración, 0,076; 0,15 y 2,00 µg/ml.

La exactitud del método se determinó comparando las alturas de pico obtenidas con soluciones estándar de CBZ preparadas en plasma *previamente* desproteínizado, las que representaron el 100%, con aquellas obtenidas cuando la desproteínización con acetonitrilo se realizó *después* del mezclado de las soluciones estándares con el plasma, como se indicó en *Preparación de las soluciones estándar*. La exactitud se expresó como el porcentaje recuperado de cinco determinaciones a tres niveles de concentración, uno cerca del LC (0,076 µg/ml), otro en el medio del rango (0,15 µg/ml) y uno próximo al lí-

mite superior de la curva de calibración (2,00 µg/ml).

La especificidad del método respecto a la matriz biológica fue establecida empleando seis muestras independientes de dicha matriz. Para ello se utilizó plasma humano libre de droga obtenido a partir de seis voluntarios sanos.

Por otra parte, se estableció la selectividad del método respecto a Cafeína (CF), ya que ésta es una droga presente en diversas bebidas que los voluntarios suelen ingerir habitualmente, por lo cual se consideró que podría ser una potencial interferencia.

También se estudió la estabilidad en el corto plazo de CBZ en plasma humano bajo las condiciones experimentales del presente trabajo. Se determinó por triplicado la influencia de tres ciclos de congelamiento-descongelamiento a dos niveles de concentración, 0,20 y 2,00 µg/ml. Para ello, tres muestras independientes de cada nivel de concentración fueron almacenadas a -20 °C durante 24 h, luego de lo cual se dejaron descongelar libremente a temperatura ambiente, para volver a repetir el ciclo de congelamiento-descongelamiento dos veces más. Las muestras se analizaron al inicio del ensayo y luego del tercer ciclo, y se calculó la relación entre la altura de pico de CBZ obtenida antes y después de los ciclos.

Por otro lado, las mismas muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente de 4 a 24 h y analizadas para establecer su estabilidad durante el período de tiempo en que las mismas permanecen en esas condiciones durante cada día de trabajo.

Aplicación

El método fue aplicado a la determinación de los parámetros farmacocinéticos de CBZ en un voluntario sano, no fumador, con características antropométricas normales, sin antecedentes de alcoholismo ni hipersensibilidad a la droga ni a ninguna sustancia químicamente relacionada con ella, quién firmó un consentimiento informado para participar en el ensayo. Este estudio se realizó con la única intención de corroborar, con una aplicación práctica, las bondades del método.

Utilizando el programa PK Solutions 2.0 (Summit Research Services, Montrose, USA) se calcularon los siguientes parámetros: área bajo la curva desde tiempo cero (T_0) hasta el último tiempo de toma de muestra ($ABC_{(0,t)}$), área bajo la curva desde T_0 hasta infinito ($ABC_{(0,\infty)}$), concentración plasmática máxima ($C_{máx.}$), cociente

$C_{m\acute{a}x.}/ABC_{(0-t)}$, como una medida de la velocidad de absorción ¹⁶, tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima ($T_{m\acute{a}x.}$), constante de eliminación de primer orden (K_e), tiempo de vida media ($T_{1/2}$) y tiempo medio de residencia (MRT).

Las muestras de plasma fueron extraídas luego de la administración al voluntario de un comprimido de liberación inmediata conteniendo 200 mg de CBZ. La administración se realizó en ayunas, y ninguna otra droga fue permitida al menos 96 horas antes del estudio, como tampoco se permitió la ingesta de alcohol ni de bebidas conteniendo xantinas durante las 48 horas previas al estudio ni hasta que la última muestra fue extraída.

Las muestras de sangre fueron extraídas a tiempo cero (T_0 ó predosis), 4, 5, 6, 8, 25, 32, 49 y 104 h post-dosis. El plasma se separó inmediatamente por centrifugación a 1500 g y se almacenó a -20 °C hasta el momento de su análisis.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran los cromatogramas típicos obtenidos con muestras de plasma blanco, plasma blanco adicionado con estándares de CBZ y NTZ y plasma del voluntario luego de la administración de un comprimido de CBZ 200 mg. Se utilizó NTZ como estándar interno debido a que presentó una separación óptima respecto a CBZ. Los tiempos de retención (t_r) fueron 8,58 min para CBZ y 10,63 min para NTZ.

El método desarrollado demostró ser lineal en el intervalo de concentraciones 0,075 – 3,0 µg/ml, con un coeficiente de determinación $r^2 = 0,9976$. La ordenada al origen (a) y la pendiente (b) con sus respectivos intervalos de confianza del 95% fueron: $a = 0,0135 \pm 0,178$ y $b = 0,6797 \pm 0,102$.

El factor respuesta calculado se mantuvo constante a lo largo del intervalo de concentraciones de la curva de calibración, corroborando la hipótesis de linealidad.

Durante el análisis de los residuales, los mismos siguieron un patrón de distribución aleatorio alrededor de cero para todo el rango de concentraciones estudiado, y la suma de los mismos fue $3,33 \times 10^{-16}$. Mediante el test de Student también se demostró la correlación lineal ($p > 0,05$), tomando como hipótesis nula la no existencia de correlación entre las variables X e Y ¹⁷. Todos los resultados anteriores confirman el ajuste de los datos obtenidos al modelo lineal.

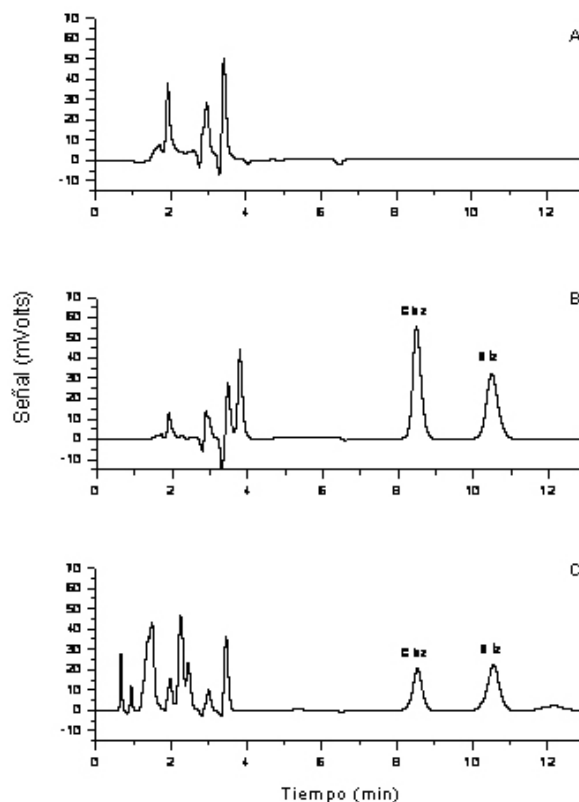


Figura 1. Cromatogramas típicos obtenidos con: (A) plasma blanco; (B) plasma blanco adicionado con CBZ (t_r 8.58) y NTZ (t_r 10.63) (t_r : tiempo de retención en minutos); (C) plasma de un voluntario luego de una administración oral de CBZ 200 mg.

El LC fue la menor concentración de la curva de calibración, 0,075 µg/ml, ya que se cumplen las siguientes condiciones: la señal de CBZ a ese nivel es al menos 5 veces mayor que la señal del blanco y el pico de CBZ es identificable, discreto y reproducible con una precisión menor del 20% y una exactitud entre el 80 y 120%.

La precisión del sistema fue 2,4% para el nivel de concentración 0,15 µg/ml y 3,2% para 2,00 µg/ml, expresado como CV. La precisión del método, junto con los resultados del ensayo de exactitud, expresado como porcentaje recuperado, para los tres niveles de concentración estudiados, se muestran en la Tabla 1. En todos

Concentración de CBZ (µg/ml)	% Recuperado (n = 5)	Precisión del método (CV%, n = 5)
0,076	83,73	4,8
0,15	97,07	3,2
2,00	98,55	2,9

Tabla 1 Resultados de los ensayos de exactitud y precisión del método, para los tres niveles de concentración estudiados.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Antes del primer ciclo de congelamiento	Después del tercer ciclo de congelamiento	(A)/(B)
	RAP ^a CBZ/NTZ (A) (n = 3)	RAP ^a CBZ/NTZ (B) (n = 3)	
0,20	0,153	0,164	1,072
2,00	0,754	0,806	1,069

Tabla 2. Estabilidad a corto plazo frente a ciclos de congelamiento-descongelamiento de Carbamazepina en plasma humano. ^a Relación de alturas de pico entre CBZ y NTZ.

Parámetros	Resultados
$ABC_{(0-104)}$ ^a	96,76 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$
$ABC_{(0-\infty)}$ ^b	117,27 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$
$C_{\text{max}}/ABC_{(0-104)}$ ^c	0,0213 h^{-1}
C_{max} ^d	2,02 $\mu\text{g/ml}$
T_{max} ^e	6 h
$T_{1/2}$ ^f	43 h
K_e ^g	0,0160 h^{-1}
MRT ^h	62 h

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos de CBZ en un voluntario sano luego de una única dosis por vía oral de CBZ 200 mg. ^a Área bajo la curva desde tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo. ^b Área bajo la curva desde tiempo cero hasta infinito. ^c Relación $C_{\text{max}}/ABC_{(0-104)}$. ^d Concentración plasmática máxima de CBZ. ^e Tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima. ^f Tiempo de vida medio. ^g Constante de eliminación de primer orden. ^h Tiempo medio de residencia (*Mean Residence Time*, MRT).

los casos se cumplió el criterio de que la precisión alrededor del valor medio no debe exceder el 15% expresada como CV, excepto en el LC en donde no debe exceder el 20% CV^{14,15}.

El método demostró ser específico respecto a la matriz biológica debido a que en ninguna de las seis fuentes independientes de plasma blanco se observaron picos interferentes con la CBZ. También se demostró la selectividad respecto a CF ya que el tiempo de retención de la misma fue de 2,14 min, no interfiriendo por lo tanto con el análisis.

Los resultados del estudio de estabilidad de CBZ en la matriz biológica demostraron la tolerancia de la misma a los ciclos de congelamiento-descongelamiento y a las condiciones normales de trabajo, ya que no se observaron diferencias significativas en las señales obtenidas antes y después de dicho estudio (Tabla 2).

En la Tabla 3 se presentan los parámetros

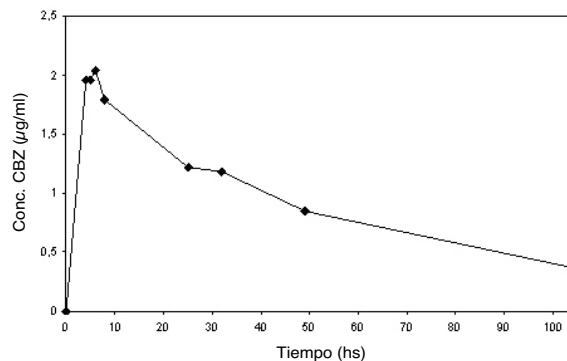


Figura 2. Perfil plasmático (Concentración vs. tiempo) obtenido luego de la administración oral de un comprimido conteniendo 200 mg de CBZ a un voluntario sano.

farmacocinéticos calculados luego de la administración de un comprimido de CBZ 200 mg al voluntario sano. El perfil de concentración vs. tiempo obtenido luego de dicha administración se muestra en la Figura 2.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los métodos analíticos utilizados para la cuantificación de drogas en muestras biológicas juegan un rol significativo en la evaluación e interpretación de los datos obtenidos en estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia y farmacocinéticos. Por ello la importancia de contar con métodos bien caracterizados, validados y por lo tanto confiables.

El método desarrollado y validado en el presente trabajo demostró poseer todos los parámetros esenciales para su aplicación a la determinación de CBZ en muestras de plasma humano: estabilidad de dicho principio activo en la matriz biológica estudiada y bajo las condiciones normales de trabajo, linealidad de la respuesta frente a la concentración, límite de cuantificación adecuado, exactitud, precisión, repetibilidad y especificidad acordes con los requerimientos para métodos bioanalíticos.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de la aplicación del método presentado al seguimiento plasmático de las concentraciones de CBZ en el voluntario sano, son equiparables a los de bibliografía¹⁸⁻²¹.

Se trata además de un método simple, poco costoso y de rápida aplicación que ofrece una opción para aquellos que trabajan en farmacoci-

nética y deben adecuar metodologías analíticas a las condiciones de equipamiento con que cuenta su laboratorio. Por lo tanto, puede utilizarse en toda clase de estudios clínicos que incluyan voluntarios humanos sanos, utilizando plasma como fluido biológico, tales como estudios de bioequivalencia y/o estudios farmacocinéticos de CBZ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yacobi, A., S. Zlotnick, J.L. Colaizzi, D. Moros, E. Masson, Z. Abolfathi, M. Lebel, R. Mehta, Y. Golander & B. Levott (1999) *Clin. Pharmacol. Ther.* **125**: 389-94.
2. Goodman & Gilman (1996) "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica" (McGraw-Hill Interamericana, ed.) México, D.F., Vol. 1, págs. 541-56
3. McLean, A., S. Browne, Y. Zhang, E. Slaughter, C. Halstenson & R. Couch (2001) *J. Clin. Pharmacol.* **41**: 183-86.
4. Meyer, M. C. & A.B. Straghn (1993) *Am. J. Hosp. Pharm.* **50**: S17-22.
5. Welty, T. E., P.R. Pickering, B. Hale & R. Arazi (1992) *Ann. Pharmacotherapy* **26**: 775-7.
6. Gilman, J.T., L.A. Alvarez & M. Duchowny (1993) *Neurology* **43**: 2696-7.
7. Volonté, M.G., M.A. Viñas, P.M. Buschiazzo, M.V. Piersante, M.C. Escales & C. Gorriti (2004) *Acta Farm. Bonaerense* **23**: 391-7.
8. Franceschi, L. & M.A. Furlanut (2005) *Pharmacol. Res.* **51**: 297-302.
9. Mandrioli, R., F. Albani, G. Casamenti, C. Sabboni & M.A. Raggi (2001) *J. Chromatogr. B* **762**: 109-16.
10. Bhatti, M.M., G.D. Hanson & L. Schultz (1998) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**: 1233-40.
11. Van Rooyen, G F., D. Badenhorst, K.J. Swart, H.K.L. Hundt, T. Scanes & A.F. Hundt (2002) *J. Chromatogr. B* **769**: 1-7.
12. Patil, K.M. & S L. Bodhankar (2005) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**: 181-6.
13. Brunetto, M.R., M.A. Obando, A. Fernández, M. Gallignani, J.L. Burguera & M. Burguera (2002) *Talanta* **58**: 535-42.
14. United States. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (2001) *Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation*. Rockville, Disponible en <<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>>. Acceso [26 de febrero de 2008].
15. Shah, V.P., K K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pittman & S. Spector (1992) *J. Pharm. Sci.* **81**: 309-12.
16. Quiroga, P, G. Yuln, M. Palummo, A. Cingolani, L. Dall & M.G. Volonté (2001) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **27**: 1099-106.
17. Quattrocchi, O.A., S.I.A. De Andrizzi & R F. Laba (1992) "Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica" (Quattrocchi, Abelaira, Laba eds.), Buenos Aires, págs. 312-5.
18. Ruiz, A., M.M. Restrepo, F. Cuesta, J. Giraldo, R. Archbold & G. Holguín (2000) *Iatreia* **13**: 131-9.
19. Jung, H., R.C. Milán, M.E. Girard, F. León & M.A. Montoya (1997) *Int. J. Pharm.* **152**: 37-44.
20. Lake, O. A., M. Olling & D.M. Barends (1999) *Eur. J. Pharmaceut. Biopharm.* **48**: 13-9.
21. Moffat A.C., M.D. Osselton & B. Widdop (2004) *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Third Edition, Pharmaceutical Press, London.