

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

**Přehled metod pro stanovení antihypertenziv typu ACE inhibitorů
v biologickém materiálu**

Bakalářská práce

Hradec Králové 2010

Petra Čechurová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Současně bych tímto ráda poděkovala vedoucímu této bakalářské práce Doc. RNDr. Miloslavu Poláškoví, CSc., za ochotu, čas, cenné rady a připomínky, kterými významně přispěl ke vzniku této práce.

Petra Čechurová

Obsah:

Seznam použitých zkratek:.....	4
Cíl práce:.....	6
1. Vzorky biologického materiálu	7
2. Inhibitory enzymu konvertujícího angiotenzin	7
2.1 Chemické vlastnosti:	7
2.2 Farmakologie:	8
3. Stanovení ACE inhibitorů:.....	13
4. Stanovení perindoprilu a enalaprilu:.....	14
4.1 Chromatografie:.....	14
4.2 Průtokové metody:.....	20
4.3 Spektrofotometrie:.....	22
5. Závěr:.....	27
6. Citovaná literatura:.....	28

Seznam použitých zkratk:

CE-MS	kapilární elektroforéza-hmotnostní spektrometrie
GC-MS	plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
LC-MS	kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ACE	angiotensin konvertující enzym
CAP	captopril
ENA	enalapril
LIS	lisinopril
QUI	quinapril
TRA	trandolapril
FOS	fosinopril
BEN	benzapril
MOE	moexipril
CIL	cilazapril
IMI	imidapril
DEL	delapril
PER	perindopril
SPI	spirapril
TEM	temocapril
ZOF	zofenopril
UV	ultrafialová část spektra
VIS	viditelná část spektra
BCD	biochemická detekce
LLE	extrakce v systému dvou nemísitelných kapalin
SPE	extrakce na tuhé fázi
IS	vnitřní standard
TIS	turboiontový sprej
RSD	relativní směrodatná odchylka
FIA	průtoková injekční analýza
SIA	sekvenční injekční analýza
L-AAOD	oxidáza L-aminokyselin
D-AAOD	oxidáza D-aminokyselin

DDQ	2,3-dichlor-5,6-dikyano-p-benzochinon
TCNQ	7,7,8,8-tetrakyanochinodimetan
TCNE	tetrakvanoethylen
CL	chloranilin
p-CA	p-chloranilová kyselina
HLB	hydrofilní-lipofilní rovnováha
mRM	multiple reaction monitoring

Cíl práce:

Hypertense, neboli vysoký krevní tlak, je v dnešní době závažným problémem, postihujícím velkou část naší populace. Jedny z nejvíce používanějších léků, řešících tento problém, jsou založeny na inhibici enzymu konvertujícího angiotensin- tzv. ACE inhibitory.

Kvůli této skutečnosti je nutné znát přesné a citlivé metody stanovení těchto léčiv, popřípadě jejich metabolitů ve vzorcích biologického materiálu, jako je moč, plasma atd., ale také například v odpadních vodách.

Cílem této práce je poskytnout přehled moderních analytických metod, používaných ke stanovení ACE inhibitorů ve vzorcích biologického materiálu. Zvláštní pozornost je věnována dvěma zástupcům z této skupiny, a to perindoprilu a enalaprilu.

K vyhledávání informací a odborných článků byly použity databáze ScienceDirect, Web of Science a Scopus.

1. Vzorky biologického materiálu

Biologickým materiálem se v klinické praxi označuje materiál biologického původu, tj. pocházející z organismu člověka. Nejčastější vzorky určené k vyšetření jsou krev, moč, hlen, stolice, vzorky z biopsie aj., popřípadě orgány a tkáně odstraněné při operaci a další.

Vzhledem k možné přítomnosti choroboplodných zárodků se s biologickým materiálem musí zacházet jako s potenciálně infekčním – včetně jeho likvidace. Podobně se postupuje v případě nástrojů či jiných předmětů, které s ním přišly do styku.[1]

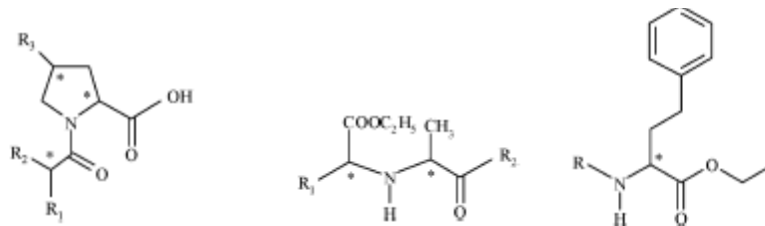
2. Inhibitory enzymu konvertujícího angiotenzin

Captopril (CAP), enalapril (ENA), lisinopril (LIS), quinapril (QUI), trandolapril (TRA), ramipril (RAM), fosinopril (FOS), benzapril (BEN), moexipril (MOE), cilazapril (CIL), imidapril (IMI), delapril (DEL), perindopril (PER), spirapril (SPI), temocapril (TEM), zofenopril (ZOF)- tyto látky náleží do skupiny inhibitorů enzymu konvertujícího angiotenzin. Z enzymatického hlediska to jsou peptidyldipeptidhydrolasy. V terapii se využívají jako velmi účinná a bezpečná antihypertenziva, v léčení srdeční nedostatečnosti, infarktu myokardu, chronického srdečního selhání. Jsou to látky, které ovlivňují renin-angiotenzinový systém. Snižují úmrtnost i u vysoce rizikových pacientů.[2]

2.1 Chemické vlastnosti:

Chemické struktury a chiralita:

V literatuře se zatím vyskytuje jediná klasifikace chemických struktur ACE inhibitorů. První třída zahrnuje léčiva obsahující sulfhydrylovou skupinu (např. CAP a jeho analogy), druhá zahrnuje léčiva na bázi karboxyalkyldipeptidů (např. ENA a jeho analogy) a třetí třída- léčiva obsahující atom fosforu (FOS). V současnosti bylo navrženo další kritérium. Vyváženější rozdělení je založeno na vymezení tří hlavních společných struktur. ACE inhibitory jsou děleny do tří skupin: deriváty prolinu (1.skupina), N-[(1-methyl-2-oxo)ethyl]glycinethylesteru (2.skupina) a ethyl-2-amino-4-fenylbutyrátu (3.skupina).



Obrázek 1: skupina 1

skupina 2

skupina 3

Každá příslušná molekula sloučeniny obsahuje alespoň 2 centra chiralit, která se nacházejí v základní struktuře i v postranních řetězcích. Bylo zjištěno, že S- stereoizomery jsou biologicky aktivní, zatímco R- stereoizomery nevykazují žádnou inhibiční činnost. Proto musí být stereoizomerní čistota během syntézy léčiv přísně monitorována, např. metodou HPLC. S ohledem na to, že všechna tato léčiva jsou z pohledu chemické struktury karboxylové kyseliny, nebo případně jejich soli, bude se toto projevovat i v jejich elektroforetických vlastnostech. Karboxyskupina bude po rozštěpení řetězce vykazovat záporný náboj a to se projeví v rychlosti jejich migrace.

Cis/trans izomerie:

Vliv cis a trans izomerie na chromatografické chování ACE inhibitorů (LIS, ENA) byl popsán Tsakalovem a spol. a Kocianem a spol. Konfigurace prolinových vazeb LIS a ENA molekul může být cis, nebo trans. Obecně je u peptidů preferována konfigurace trans, ale v látkách, které obsahují prolin, pravděpodobně nastane cis konfigurace. Vzájemná přeměna cis a trans izomerů se může odehrát v důsledku snížené energetické bariéry, ale rotace kolem peptidové vazby je omezena z důvodu částečného charakteru dvojné vazby. Během chromatografické separace ENA a podobných sloučenin může vzájemná přeměna izomerů ovlivnit tvar píku, nebo dokonce pik rozštěpit. To pak může vést k chybné interpretaci. Udává se, že tvar píku silně závisí na teplotě, pH a průtokové rychlosti mobilní fáze: ACE inhibitory eluují jako jeden ostrý pik při vysoké teplotě kolony (80°C) a nízkém pH (2). [3]

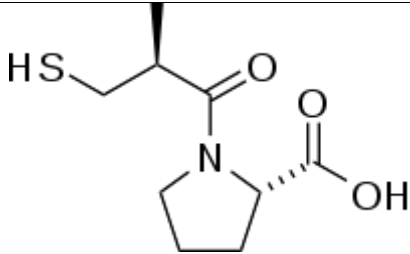
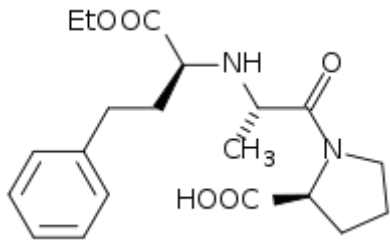
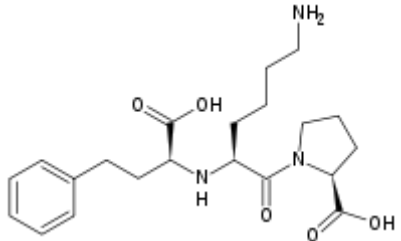
2.2 Farmakologie:

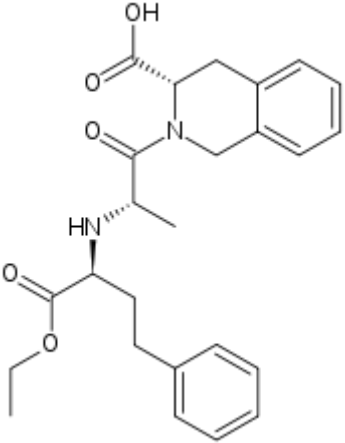
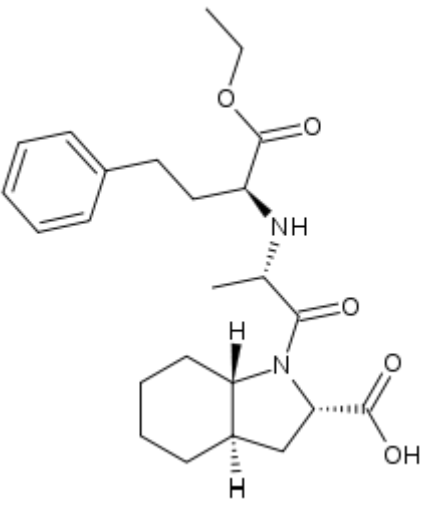
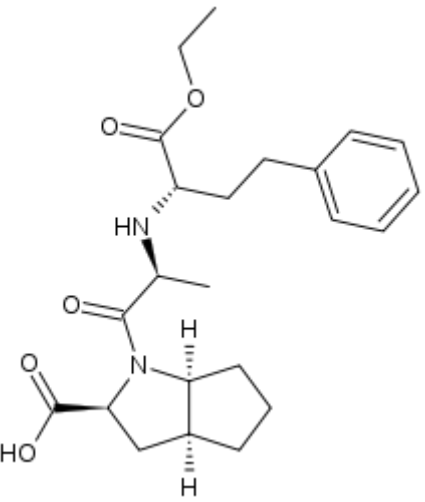
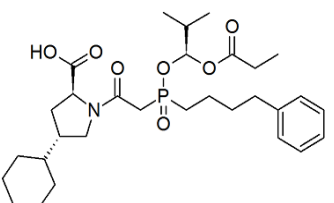
Inhibicí enzymu konvertujícího angiotensin tyto látky brání přeměně neúčinného angiotenzinu I na vysoce účinný angiotenzin II, dále brání rozpadu bradykininu a tím zvyšují jeho koncentraci a účinek. Bradykinin je však společně se substancí P pravděpodobně odpovědný za jejich nežádoucí účinky, čímž jsou suchý kašel a angioneurotický edém. Výsledný efekt působení ACE inhibitorů je tedy výrazný pokles periferní cévní rezistence,

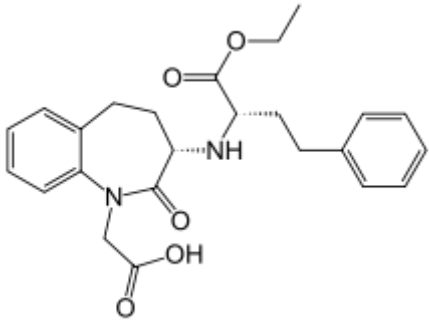
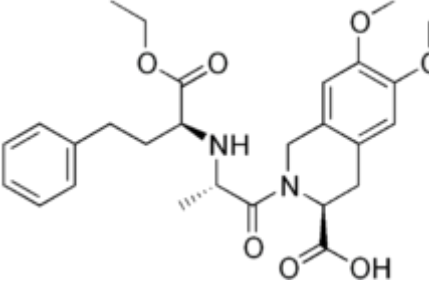
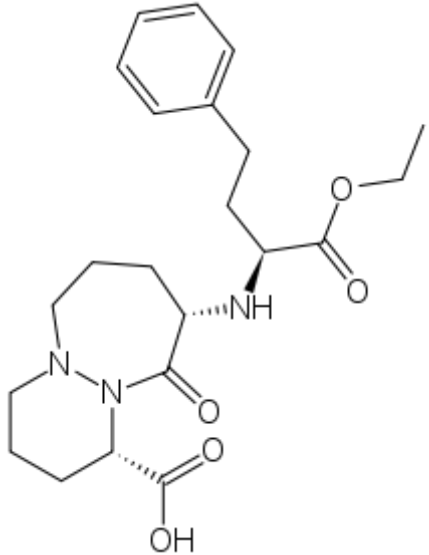
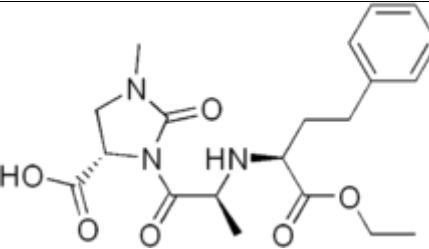
mírný venodilatační účinek a pokles plazmatické koncentrace aldosteronu. Inhibitory ACE poklesem tlaku však nezvyšují baroreceptory zprostředkované zrychlení srdeční akce, zvýšení srdečního výdeje, ani zvýšení myokardiální kontraktility. Nemají žádné metabolické účinky, čímž neovlivňují sérové lipidy a glycidy. [2]

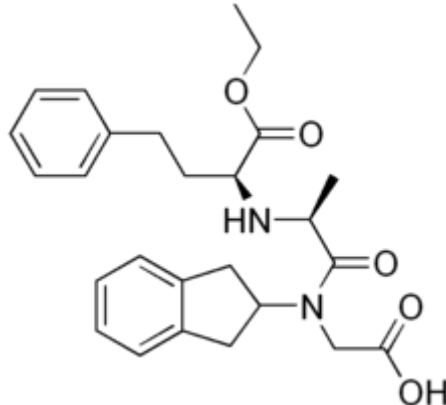
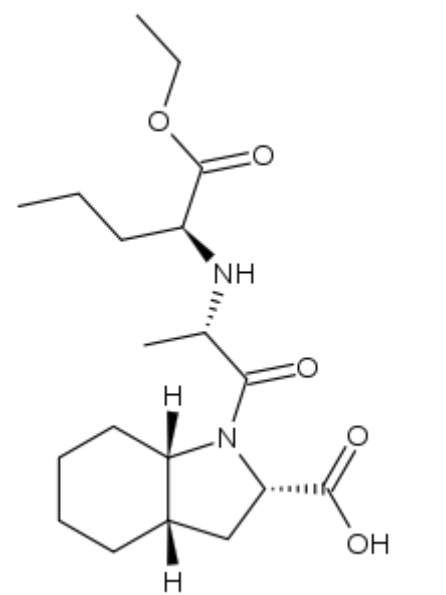
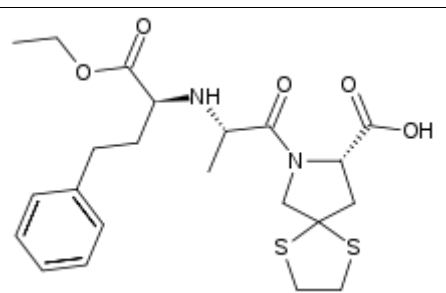
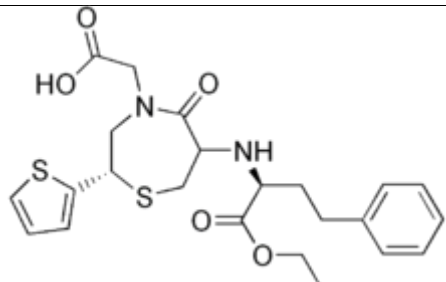
Captopril- první ze skupiny ACE inhibitorů byl syntetizován v roce 1977, následován dalšími novými sloučeninami podobných účinků a delšími biologickými poločasy. Příslušné aktivní metabolity byly zkráceny přidáním přípony –át (např. BEN- át pro benazaprilát). CAP a LIS jsou aktivní jako takové, většina ostatních ACE inhibitorů jsou proléčiva, která vyžadují jaterní aktivaci na farmaceuticky aktivní metabolity. [3]

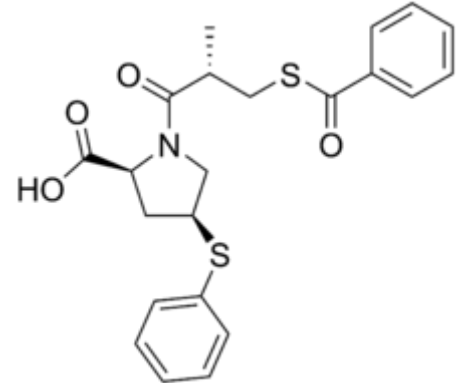
Tabulka 1: Názvy, zkratky, systematické názvy a vzorce ACE inhibitorů. [4]

Ace inhibitor	Zkratka	Systematický název	Vzorec
Captopril	CAP	(2S)-1-[(2S)-2-methyl-3-sulfanylpropionyl]pyrolidin-2-karboxylová kyselina	
Enalapril	ENA	(2S)-1-[(2S)-2-[(2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-fenylbutan-2-yl]amino}propionyl]pyrrolidin-2-karboxylová kyselina	
Lisinopril	LIS	N ² -[(1S)-1-karboxy-3-fenylpropyl]-L-lysyl-L-prolin	

Quinapril	QUI	(3S)-2-[(2S)-2-[[2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-fenylbutan-2-yl]amino}propionyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-karboxylová kyselina	 <p>The structure shows a quinoline ring system with a carboxylic acid group at position 3. At position 2, there is a propionyl chain with an amino group. This amino group is substituted with a 1-ethoxy-1-oxo-4-phenylbutan-2-yl group.</p>
Trandolapril	TRA	(2s,3aR,7aS)-1-[(2S)-2-[[2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-fenylbutan-2-yl]amino}propionyl]-oktahydro-1H-indol-2-karboxylová kyselina	 <p>The structure features an octahydro-1H-indole ring system with a carboxylic acid group at position 2. At position 1, there is a propionyl chain with an amino group. This amino group is substituted with a 1-ethoxy-1-oxo-4-phenylbutan-2-yl group.</p>
Ramipril	RAM	(2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-[[2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-fenylbutan-2-yl]amino}propionyl]-oktahydrocyklopenta[b]pyrrol-2-karboxylová kyselina	 <p>The structure shows an octahydrocyclopenta[b]pyrrole ring system with a carboxylic acid group at position 2. At position 1, there is a propionyl chain with an amino group. This amino group is substituted with a 1-ethoxy-1-oxo-4-phenylbutan-2-yl group.</p>
Fosinopril	FOS	(2S,4S)-4-cyklohexyl-1-(2-[[2-methyl-1-(propionyloxy)propoxy](4-fenylbutyl)fosforyl]acetyl)pyrrolidin-2-karboxylová kyselina	 <p>The structure consists of a pyrrolidine ring with a carboxylic acid group at position 2 and a cyclohexyl group at position 4. At position 1, there is an acetyl group. This acetyl group is substituted with a 2-[[2-methyl-1-(propionyloxy)propoxy](4-phenylbutyl)fosforyl] group.</p>

Benzapril	BEN	2-[(3S)-3-[[[(2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-fenylbutan-2-yl]amino]-2-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepin-1-yl]octová kyselina	
Moexipril	MOE	(3S)-2-[(2S)-2-[[[(2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-fenylbutan-2-yl]amino]propionyl]-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-karboxylová kyselina	
Cilazapril	CIL	(1S,9S)-[[[(2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-fenylbutan-2-yl]amino]-10-oxo-oktahydro-1H-pyridazino[1,2-a][1,2]diazepine-1-karboxylová kyselina	
Imidapril	IMI	(4S)-3-[(2S)-2-[[[(2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-pentylbutan-2-yl]amino]propionyl]-1-metyl-2-oxoimidazolidin-4-karboxylová kyselina	

Delapril	DEL	2-[(2S)-N-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)-2-[[[(2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-fenylbutan-2-yl]amino}propanamid] octová kyselina	
Perindopril	PER	1H-indol-2-karboxylová kyselina	
Spirapril	SPI	(8S)-α-[[[(2S)-2-[[[(2S)-1-ethoxy-1-oxo-4-fenylbutan-2-yl]amino}propionyl]-1,4-dithio-7-azaspiro[4.4]nonan-8-karboxylová kyselina	
Temocapril	TEM	[[[(2S)-6-[[[(1S)-1-(ethoxykarbonyl)-3-fenylpropyl]amino}-5-oxo-2-(2-thienyl)-1,4-thiazepan-4-yl] octová kyselina	

Zofenopril	ZOF	(4S)-1-[(2S)-3-(benzoylthio)-2-methylpropionyl]-4-(fenylthio)-L-prolin	
------------	-----	--	---

3. Stanovení ACE inhibitorů:

V dříve popsaných testech byla pro stanovení ACE inhibitorů použita široká škála bioanalytických technik. V předchozích studiích (80. Léta a začátek 90. let) byly používány enzymatické metody a radioimunoanalýza. Ačkoli velmi citlivé, byly tyto metody velmi drahé a k dosažení žádoucí přesnosti byla nutná trojitá analýza vzorku. Navíc bylo obtížné určit proléčivo a koncentraci metabolitu v jedné analýze.

Naproti tomu, mnoho HPLC testů s UV-VIS, fluorescenční, elektrochemickou a voltametrickou detekcí v tomto směru dosahovalo lepších výsledků. Většina z nich však vyžadovala složitou předpřípravu vzorku a časově náročnou chromatografickou separaci. Hlavní nevýhodou byla ale citlivost, která obvykle nebyla dostačující pro farmakokinetické studie.

Byly také publikovány práce využívající tenkovrstvou radiochromatografii a kapilární elektroforézu s laserem indukovanou fluorescenční detekcí.

Od samého začátku byly pro určení ACE inhibitorů v biologickém materiálu široce používány tandemové hyphenční techniky. Použití GC-MS a LC-MS nejenže v mnoha bioanalytických laboratořích nahradilo nebezpečné a drahé radioaktivní značení sloučenin, ale také umožnilo souběžné stanovení proléčiva a jeho metabolitů. Metoda GC-MS byla použita pro analýzu léčiv v roce 1980. GC-MS poskytla spolehlivé výsledky, ale stále zahrnovala předpřípravu vzorku a to jak jeho extrakci, tak i náročné derivatizační kroky.

Metoda hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií (MS-LC) byla prvně pro stanovení ACE inhibitorů použita v roce 1999. Mezi hlavní důvody pro použití LC-MS v bioanalýze byla lepší selektivita a citlivost, z níž vyplynulo zjednodušené předčištění vzorku i kratší doba analýzy.

Předpříprava vzorku:

Přestože je hmotnostní detekce velmi selektivní, nelze úplně vynechat přípravu vzorku. Nejenže z komplexu biomatrice odstraníme interferující endogenní látky, ale také můžeme zvýšit koncentraci analytu. Dá se konstatovat, že GC-MS metoda vyžaduje rozsáhlejší předčištění vzorku. Analyty většinou vyžadují derivatizační přeměnu do těkavé a tepelně stabilní molekuly. Postupy přípravy vzorků popsané u téměř poloviny metod jsou komplexní, zahrnují extrakci mezi dvě nemísitelné kapaliny (LLE), vysrážení proteinů, extrakci na tuhé fázi (SPE) a sloupcovou chromatografii, všechny kombinované v různém pořadí. Nejvíce se používá SPE následovaná derivatizací, dále LLE v kombinaci s derivatizací.

Nejčastěji používané náplně u HPLC jsou založeny na oktadecylu a na principu HLB, další například na cyklohexylu. Analyty jsou obvykle eluovány metanolem. V některých případech byla u LC-MS použita precipitace proteinů a LLE. Nejpoužívanější organické rozpouštědlo pro LLE je ethylacetát (dále diethylether, dichlormethan, dichlorethan, isopropanol, hexan, toluen...). [3]

4. Stanovení perindoprilu a enalaprilu:

4.1 Chromatografie:

Chromatografie je rozdělovací separační metoda, při níž se oddělují složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především kvalitativní a kvantitativní analýza vzorku. Vzorek se vnáší mezi dvě nemísitelné fáze- stacionární, která je nepohyblivá a mobilní, která je pohyblivá. Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze přes fázi stacionární je touto soustavou unášen. Složky vzorku jsou během pohybu zachycovány na stacionární fázi a tím dochází ke zpomalení jejich pohybu. Více jsou zachycovány složky vzorku, které jsou stacionární fázi poutány silněji. Tím se složky od sebe postupně separují. Ze stacionární fáze se eluují dříve ty analyty, které jsou méně zachycovány. [5]

LC:

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace: adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii. Dle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkovrstvou či papírovou chromatografii. [5]

GC:

Vzorek se dávkuje do proudu plynu, který jej dále unáší kolonou. Proto se mobilní fáze nazývá nosný plyn. Aby vzorek mohl být transportován, musí se ihned přeměnit na plyn. V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor. Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek. [5]

HPLC:

Aparaturou protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony, z ní do detektoru a dále pak do odpadu. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek (řádově několik málo μl). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí PC a tisknut v podobě chromatogramu. [6]

Stanovení perindoprilu a enalaprilu pomocí chromatografie:

Pro stanovení perindoprilu a jeho aktivního metabolitu perindoprilátu ve vzorcích lidské plasmy byla vyvinuta vysokoúčinná bioanalytická metoda založená na extrakci na tuhé fázi (SPE) a kapalinové chromatografii tandemově spojené s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Jako vnitřní standard (IS) je použit ramipril, další ze skupiny ACE inhibitorů. Extrakce perindoprilu, perindoprilátu a ramiprilu z plasmy zahrnuje ošetření kyselinou fosforečnou, následované SPE na základě hydrofilní a lipofilní rovnováhy. Eluát je bez sušení analyzován LC-MS/MS systémem, vybaveným zdrojem turbo iontového spreje (TIS). Celkový chromatografický čas byl 1,5 minuty s retenčními časy 0,33 min pro perindopril, 0,35 min pro perindoprilát a 0,30 min pro ramipril. Metoda byla validována ve vzorku lidské plasmy s citlivostí 0,5 ng/ml (RSD, 7,67%) pro perindopril a 0,3 ng/ml (RSD, 4,94%) pro perindoprilát. Návratnost metody je 78,29% pro perindopril, 76,32% pro perindoprilát a 77,72% pro IS. Korelační koeficient $r = 0,9998$ a $0,9996$. [7]

Metoda kapilární plynové chromatografie je založená na derivatizaci perindoprilu pentafluorbenzylbromidem v acetonu, za použití uhličitanu draselného jako katalyzátoru. Za optimálních podmínek byl vysoce polární a netěkavý perindopril derivatizován do vhodného chromatografického stavu. Vzorek byl separován na kapilární koloně a detekován plamenovou ionizací. [8]

Perindopril má dvě hlavní cesty degradace: hydrolytickou a cyklizační. Metoda je založena na stanovení degradačních rychlostí použitím mikrokalorimetrie a HPLC.

Mikrokalorimetr, pracující v izotermálním modu a HPLC systém s UV detekcí se použijí pro charakterizaci vodných roztoků perindoprilu a pro stanovení jejich stabilit. V roztocích analytu o různých hodnotách pH byly za různých teplotních podmínek měřeny koncentrace a degradační produkty. Během degradace je vyprodukované teplo měřeno mikrokalorimetrem jako funkce teploty a pH. Z naměřených dat byla určena změna entalpie a rychlost reakce. HPLC systém měří koncentrace perindoprii a jeho degradačních produktů v závislosti na čase.

Bylo zjištěno, že při pH 6,8 má perindopril jedinou degradační cestu a to hydrolyzu. [9]

Pro stanovení enalaprilu a jeho hlavního aktivního metabolitu enalaprilátu v plasmě byla vyvinuta rychlá, jednoduchá a specifická metoda na bázi kapalinové chromatografie-ionizace elektrosprejem- hmotnostní spektrometrie (LC-ESI-MS). Jako vnitřní standard byl použit benzapril. V plasmě byly acetonem vysráženy proteiny a byla zcentrifugována. Hmotnostní spektra byla měřena v ESI a APCI pozitivním i negativním módu. [10]

Rychlá, citlivá a vysoce selektivní metoda pro současné stanovení enalaprilu a enalaprilátu v lidské plasmě je kapalinová chromatografie tandemově spojená s hmotnostní spektrometrií. Analyty jsou ze vzorku plasmy separovány metodou LLE. [11]

Pro separaci enalaprilu ze vzorků plasmy s minimální předpřípravou vzorku lze použít reverzní kapalinovou chromatografii ve spojení s ionizací elektrosprejem a hmotnostní spektrometrií. Detekční limit metody je 1 ng/ml. [12]

Metoda HPLC lze použít i pro nepřímé stanovení enalaprilu ve vzorcích lidské plasmy. ACE inhibitor byl určen reakcí s hippuril-histidil-leucinem za vzniku kyseliny hippurové, jež je nepřímo úměrná obsahu enalaprilu v plasmě. [13]

Citlivá a rychlá metoda pro kvantifikaci enalaprilu a enalaprilátu v plasmě je založena na LC-MS-MS kombinované s rychlou extrakcí na pevné fázi, která následuje po přidání vnitřního standardu do vzorku. Extrakty jsou analyzovány metodou HPLC. Současná detekce enalaprilu a enalaprilátu je prováděna metodou MS v mRM modu. Rozmezí koncentrací je 0.2 až 1.0 ng/ml. [14]

Enalaprilát lze stanvit také pomocí reverzní vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí. Metoda stanovení dává lineární odpověď přes koncentraci 1,200 µg/ml s přesností 97,35 +/- 4,93%. Koncentrační rozmezí se pohybuje mezi 0,125 a 0,5 µg/ml. [15]

Tabulka 2: Přehled GC a HPLC metod stanovení perindoprilu a enalaprilu

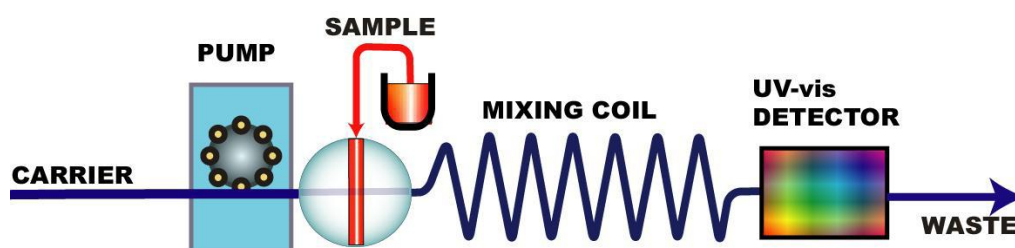
Mobilní fáze, rychlost průtoku	Stacionární fáze, rozměry	Rozmezí koncentrací	Detekce	Retenční čas	Materiál	Citace
vodný 0,21% NH ₃ – metanol 20:80 (v/v); 0,3 ml/min	TEC XTerra MS C8 (30 mm x 2,1 mm)	0,5-350,0 ng/ml PER, 0,3-40,0 ng/ml PERát	MS	1,5 min	Plasma	[7]
-	SE-54 capillary column	20-300 nmol	Plameno vá ionizační	Není udáno	Tablety	[8]
heptansulfonátový pufr pH 2,0 – acetonitril, gradientová eluce; 0,5 ml/min	Hypersil ODS (250 mm x 4 mm, 5 μm)	1 – 100 μg/ml	UV (215 nm)	1,1,2 min	Vodný roztok léčiva	[9]
metanol– 20 mM amonium acetát (53:47, v/v), 0,25 mL /min	Thermo Hypersil-HyPURITY C18 (150 mm x 2,1 mm, 5 μm)	1,6 – 400 ng/ml	MS	2,7 min	Plasma	[10]

Mobilní fáze, rychlost průtoku	Stacionární fáze, rozměry	Rozmezí koncentrací	Detekce	Retenční čas	Materiál	Citace
Metanol-voda-kys. mravenčí (70:30:1, v/v/v), 0,6 ml/min	Zorbax Extend-C18 (15 mm×4.6mm, 5 μm)	0,10-100,0 ng/ml	MS	3,5 min	Plasma	[11]
Deionizovaná voda : acetonitril (67:33, v/v), 0,3 ml/min	Waters Xterra C18 (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm)		MS	1,33 min (ENA), 1,34 min (IMI)	Plasma	[12]
acetonitril – fosfátový pufr pH 2,3, gradientová eluce, 1 ml/min	Lichrosphere ((R)) 60RP-select B (C18,125 mm x 4.0 mm, 5 μm)	3 -120 ng/ml	UV (228 nm)	4,83 min	Plasma	[13]
10 mM vodný mranvenčanový pufr pH 4 – 10mM mrančan amonný v 90% metanolu, gradientová eluce, 0,2 ml/min	Hydrosphere C18 (50 x 2,0 mm; 3 μm)	0,2 – 200 ng/ml	MS	3,95 min	Plasma	[14]
voda–acetonitril–kyselina orthofosforečná (90:10:1, v:v:v), 0.7 ml/min	Shodex C18	1 – 200 μg/ml	UV (215 nm)	6,37 min	Tablety	[15]

4.2 Průtokové metody:

FIA:

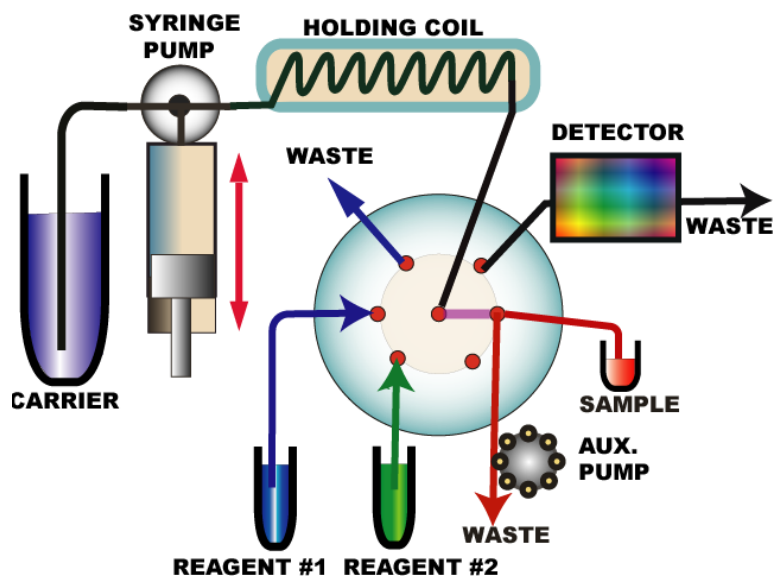
Průtoková injekční analýza je kinetická metoda, při níž je mísení vzorku a činidla neúplné a chemická reakce nedosahuje rovnováhy. Malé objemy vzorků jsou postupně injektovány pomocí dávkovacího ventilu s vyměnitelnou smyčkou do proudu činidla. Získaný signál je nestacionární, má tvar nesymetrického píku. Vyhodnocovat lze výšku píku, plochu píku, šířku píku ve zvolené výšce, dobu od nadávkování vzorku po maximum píku. Díky aspiraci přesného objemu vzorku a přesnému dodržování experimentálních podmínek má tato metoda vysokou reprodukovatelnost. [16],[17]



Obrázek 2 : Systém FIA. [16]

SIA:

Sekvenční injekční analýza byla odvozena od FIA, obě metody jsou si podobné, avšak SIA představuje samostatný přístup k analýze v průtokovém uspořádání. V metodě SIA je dávkovací ventil s vyměnitelnou smyčkou nahrazen obvykle 6 až 10 pozičním selekčním ventilem. Jako čerpadlo se nejčastěji používá mikropístová pumpa poháněná přesným krokovým motorem. Nosný roztok společně s činidlem proudí skrz selekční ventil do reakční cívky, současně unáší zónu vzorku a dochází k reakci mezi vzorkem a činidlem. [17]



Obrázek 3: Systém SIA. [16]

Amperometrické biosenzory:

V amperometrii je na pracovní elektrodu vložen konstantní potenciál a měří se proud, který jí protéká v závislosti na čase. V přítomnosti analytu je velikost tohoto proudu mírou jeho koncentrace. Potenciál pracovní elektrody je zvolen tak, aby jí tekla limitní proud analytu. Jedná se o metodu odvozenou od metod voltametrických a polarografických a lze použít stejnou instrumentaci. [18]

Stanovení perindoprilu průtokovou injekční analýzou a amperometrickým biosenzorem:

Průtokové metody (FIA, SIA) jsou dobrou alternativou chromatografie pro stanovení S a R enantiomerů. Hlavní výhodou oproti chromatografii spočívá ve vysoké přesnosti, citlivosti a správnosti, bez nutnosti složité předpřípravy vzorku a v nižší ceně analýzy. [19]

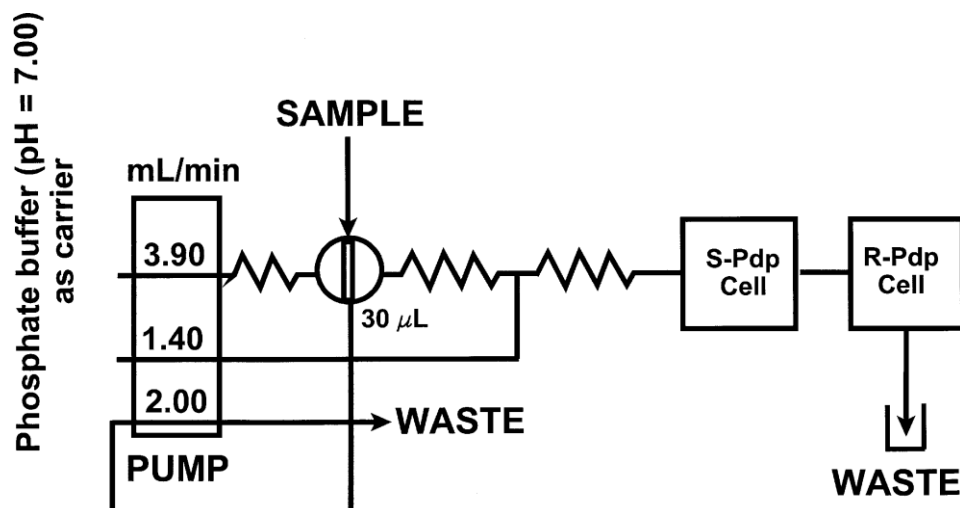
Pro současné stanovení S- a R- perindoprilu se užívají 2 metody: průtoková injekční analýza (FIA) a sekvenční injekční analýza (SIA). SIA systém je účinnější díky vyšší přesnosti, správnosti a nižší spotřebě vzorku a pufu. Systém zanalyzuje přibližně 30 vzorků za hodinu. Jako detektor byl použit amperometrický biosenzor, založený na enzymu oxidáza L-aminokyselin (L-AAOD), který je díky své vysoké citlivosti a enantioselektivitě ideální detekční zařízení pro stanovení S-perindoprilu injekční průtokovou analýzou. [20]

Biosenzor obsahuje 2 elektrody, které byly zhotoveny smísením parafinového oleje a grafitové pasty, do jedné přidán roztok enzymu L-AAOD a do druhé D-AAOD. Elektrický kontakt zajišťuje stříbrný drátek v grafitové pastě.

V obou systémech byla použita optimální průtoková rychlost 3,61 ml/min. [19]

Elektroda se ukázala být velmi užitečná pro testy čistoty enantiomerů S-perindoprilu určené chronoamperometricky. Výsledná návratnost testu byla 99,92% a směrodatná odchylka 0,36% (n= 10). [20]

Stejnou metodu lze použít i pro stanovení enantiomerů enalaprilu.



Obrázek 4: Schéma systému FIA použitého ke stanovení S- a R- perindoprilu. [19]

Chemiluminescenční metoda využívající průtokovou injekční analýzu lze využít k rychlému a velmi citlivému stanovení enalaprilu. Metoda je založena na CL reakci enalaprilu s tris(2,2'-bipyridyl) rutheniem a manganistanem draselným v kyselém prostředí. Toto stanovení bylo úspěšně aplikováno v analýze enalaprilu obsaženého jak v tabletách, tak v biologických tekutinách. [21]

4.3 Spektrofotometrie:

Molekuly mají schopnost pohlcovat elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek. Je to dáno tím, že mohou existovat v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie. Jestliže má molekula přejít ze stavu s nižší energií do stavu s energií vyšší, musí absorbovat záření o frekvenci ν , která právě odpovídá rozdílu energií mezi energetickými hladinami E_p a E_q obou kvantových stavů podle Bohrovy frekvenční podmínky:

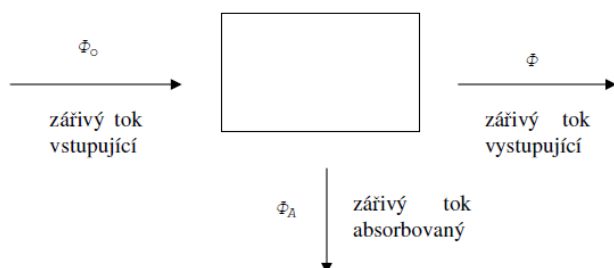
$$\Delta E = E_p - E_q = h \nu = h c / \lambda ;$$

kde c je rychlost světla, λ vlnová délka a h je Planckova konstanta.

Při absorpčním měření je ze vstupujícího toku záření Φ_0 část absorbována vzorkem

(absorbovaný zářivý tok Φ_A) a v ideálním případě zbytek projde a je zaznamenán jako vystupující zářivý tok Φ . [22]

Absorbance je veličina, která se využívá ve fotometrii a spektrofotometrii. Udává, jak mnoho světla bylo pohlceno měřeným vzorkem. Absorbance je bezrozměrná veličina. Lze vyjádřit Lambert-Beerovým zákonem, ze kterého vyplývá, že absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky. [4]



Obrázek 5: Spektrofotometrie

Atomová absorpční spektrometrie:

Podstatou metody je absorpce vhodného elektromagnetického záření volnými atomy v plynném stavu. Absorbovat se bude záření, které splňuje podmínku $E_1 - E_0 = hc/\lambda_1$, $E_2 - E_0 = hc/\lambda_2$ atd. kde E_0 je energie základní hladiny a E_1, E_2 atd. jsou energie excitovaných hladin. [5]

Jako další možnost stanovení perindoprilu a ramiprilu lze použít spektrofotometrii a atomová absorpční spektrometrii. Látky byly stanovovány ve farmaceutických přípravcích (tabletech). Spektrofotometrická metoda je založena na tvorbě ternárního komplexu příslušného léčiva s Cu^{2+} a eosinem, který je extrahován do chloroformu. Za optimálních podmínek vykazoval komplex absorpční maximum při 535 nm. Koncentrační rozmezí 10-60 $\mu\text{g/ml}$ pro perindopril a 20-100 $\mu\text{g/ml}$ pro ramipril.

Metoda atomové absorpční spektrometrie byla stanovením obsahu mědi v extrahovaném komplexu použita pro zvýšení citlivosti analýzy. [23]

Podobné je stanovení enalaprilu. Metoda je také založena na spektrofotometrii a atomové absorpční spektrometrii a na tvorbě ternárního komplexu.

Ternární komplex (měď, eosin a enalapril) byl měřen dvěma metodami. První je extrakce chloroformem a proměření při 533.4 nm. Rozmezí koncentrací se pohybovalo mezi 56 a 112 µg/ml. Druhá metoda je založena na přímém měření po přidání etylcelulózy při 558.8 nm. Koncentrační rozmezí 19-32 µg/ml.

K této problematice existuje více studií, které jsou provedením velmi podobné, liší se složením ternárních komplexů. [24]

Tabulka 3: Spektrofotometrické stanovení

Ternární komplex	Metoda	Absorpční maximum	Rozmezí koncentrací	Citace
Měď.eosin.perindopril/ramipril	Extrakce chloroformem	535 nm	10-60 µg/ml (perindopril) 20-100 µg/ml (ramipril)	[23]
Měď.eosin.enalapril	Extrakce chloroformem	533.4 nm	56-112 µg/ml	[24]
	Přímé měření po přidavku etylcelulózy	558.8 nm	19-32 µg/ml	[24]

Jednoduchá, rychlá, přesná a velmi citlivá spektrofotometrická metoda je založena na reakci léčiva perindopril jako donoru elektronu s 2,3-dichloro-5,6-dikyano-p-benzochinonem (DDQ), 7,7,8,8-tetrakyanodimethanem (TCNQ), tetrakvanoethylenem (TCNE), chloranilinem (CL) a p-chloranilinovou kyselinou, jako s akceptory π -elektronů. Výsledkem reakce jsou různé barevné produkty. Absorbance barevných produktů byla spektrofotometricky proměřena při 588, 843, 419, 550 a 520 nm. Při stanovení byl použit spektrofotometr Shimadzu UV 260. Koncentrační rozmezí 20–200 mg/ml.

Reakce DDQ s perindoprilem dává oranžovo-červený produkt, vykazující 3 absorpční maxima: při 588, 547 a 450 nm. Při vlastním stanovení byla měřena absorbance při 588 nm.

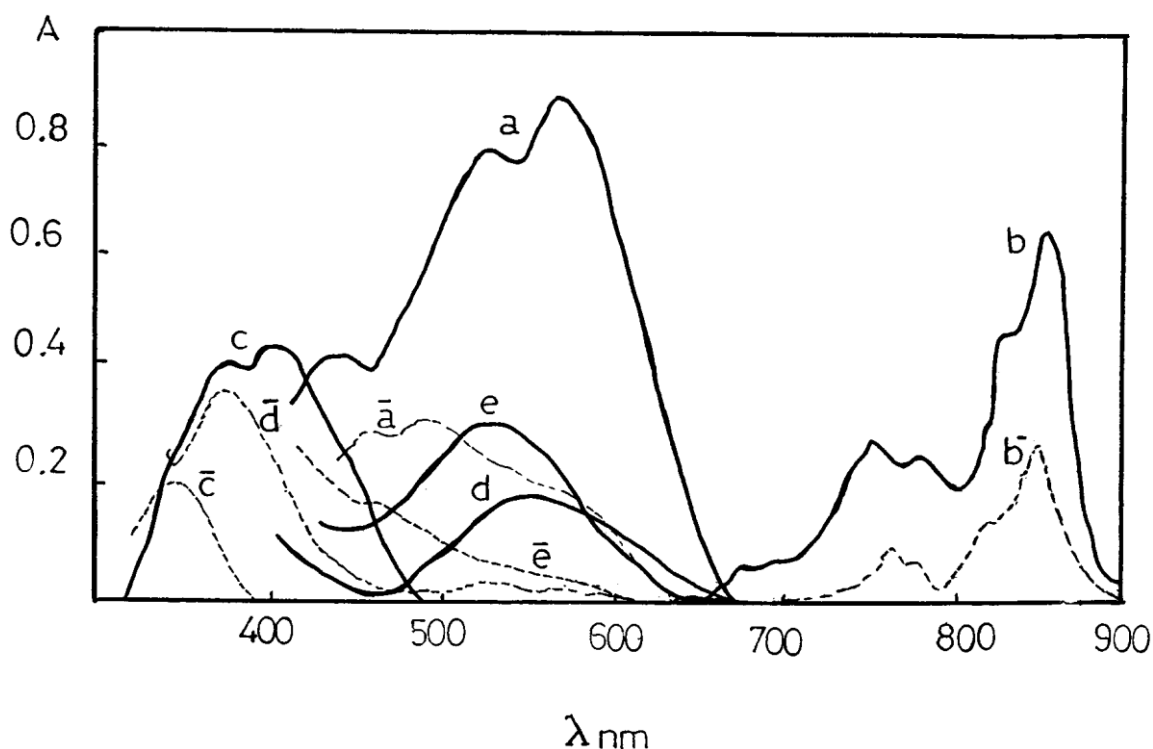
Roztok perindoprilu a TCNQ dává intenzivní modré zbarvení a způsobuje charakteristické absorpční pásy s dlouhými vlnovými délkami a četnými vibračními maximy v elektronovém spektru.

Perindopril a TCNE dává žlutý komplex s 2 maximy při 390 a 419 nm.

Reakce perindoprilu s CL a p-CA dává fialovo-oranžovo-červené produkty s absorpčními maximy při 550 a 530 nm. [25]

Tabulka 4: Spektrofotometrické podmínky

Akceptor π -elektronu	Absorpční maxima	Barevný produkt	Detekce	Citace
DDQ	588 (547,450) nm	Oranžovo-červený	VIS	[25]
TCNQ	Vibrační maxima v elektronovém spektru	Modrý	VIS	[25]
TCNE	390,419 nm	Žlutý	VIS	[25]
CL	550,530 nm	Fialovo-oranžovo-červený	VIS	[25]
p-CA	550,530 nm	Fialovo-oranžovo-červený	VIS	[25]



Obrázek 6: Absorpční spektra reakčních produktů perindoprilu (60 mg/ml) s DDQ (a), TCNQ (b), TCNE (c), CL (d), p-CA (e) a odpovídající slepé vzorky proti acetonitrilu[24].

Kinetická spektrofotometrie je jednoduchá a citlivá metoda pro stanovení perindoprilu ve farmaceutických přípravcích. Je založená na interakci 1-chlor-2,4-dinitrobenzenu (CNDB) s analytem v dimethylsulfoxidu (DMSO) při teplotě $40 \pm 1^\circ\text{C}$. Průběh reakce je sledován spektrofotometrickým měřením změny absorbance při vlnové délce 420 nm. Za optimalizovaných podmínek a v rozmezích koncentrací 20 – 140 $\mu\text{g/ml}$ se kalibrační křivka jevila jako lineární závislost.

Aktivační parametry: $E_a = 27,31 \text{ kJ/mol}$, $\Delta H = 24,69 \text{ kJ/mol}$, $\Delta S = -138,84 \text{ kJ/mol}$, $\Delta G = 61,50 \text{ kJ/mol}$. [26]

5. Závěr:

Rešeršní práce je členěna do několika oddílů. Postupně jsou vypsány statě o vzorcích biologického materiálu, farmakologických a chemických vlastnostech ACE inhibitorů a způsobů jejich separace. Nakonec jsou uvedeny konkrétní příklady analytických separací léčiv perindopril a enalapril.

6. Citovaná literatura:

- [1]- <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/biologicky-material> (19.8.2010)
- [2]- Lincová D., Farghali H.a kol.- Základní a aplikovaná farmakologie, nakladatelství Galen,2002, s. 260
- [3]- Piotr J. Rudzki, Buż K., Ksycińska H., Kobylińska K.- An overview of chromatographic methods coupled with mass spectrometric detection for determination of angiotensin-converting enzyme inhibitors in biological material, J. Pharm. Biomed. Anal., 2007, roč. 44, str. 356-367
- [4]- www.wikipedia.org (19.8.2010)
- [5]- P. Klouda- Moderní analytické metody,2005, str. 10, 25, 50, 67
- [6]- www.hplc.cz/Teorie/index.htm (18.8.2010)
- [7]- Jain D.S., Subbaiah G., Sanyal M., Pande U.C., Shrivastav P.- First LC-MS/MS electrospray ionization validated method for the quantification of perindopril and its metabolite perindoprilat in human plasma and its application to bioequivalence study. J, Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 2006, roč. 837, č. 1-2, str. 92-100- použit abstrakt databáze PubMed
- [8]- Lin S.J., Wu H.L., Chen S.H., Wen Y.H.- Derivatization gas chromatographic determination of perindopril- Anal. Lett., 1996, roč. 29, č. 10, str. 1751-1762
- [9]- Simončič Z., Roškar R., Gartner A., Kogej K., Kmetec V.- The use of microcalorimetry and HPLC for the determination of degradation kinetics and thermodynamic parameters of Perindopril Erbumine in aqueous solutions, Int. J. Pharm, 2008, roč. 356, str. 200-205
- [10]- Ping W., Yi-Zeng L., Ben-Mei Ch., Neng Z., Lun-Zhao Y., Yan Y., Zhi-Biao Y.- Simultaneous Determination of Enalapril and Enalaprilat in Human Plasma by LC-MS: Application to a Bioequivalence Study- CHromatographia, 2007, roč. 65, str. 209-215

[11]- Qi G., Xiaoyan C., Dafang Z., Yingwu W.- Simultaneous determination of enalapril and enalaprilat in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry- J. Chromatogr.,B., 2004, roč. 813, str. 337-342

[12]- Kyung-Hwan Y., Won K., Jongsei P., Hie-Joon K. - Determination of Enalapril in human Plasma by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry - Bull. Korean Chem. Soc., roč. 25, č. 6, použit abstrakt databáze Web of science

[13]- Thongnopnua P., Poeaknapo C.- High-performance liquid chromatographic determination of enalapril in human plasma by enzyme kinetic analytical method- J. Pharm. Biomed. Anal., 2005, roč. 37, č. 4, str. 763-769, použit abstrakt databáze Web of science

[14]- Lee J., Son J., Lee M., Lee K.T., Kim D.H.- Simultaneous quantitation of enalapril and enalaprilat in human plasma by 96-well solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry- Rapid Commun. Mass Spectrom., 2003, roč. 17, č. 11, str. 1157-1162

[15]- Hosnieh T., Mehrdad H.- A simple HPLC method for quantitation of enalaprilat- J. Pharm. Biomed. Anal., 2001, roč. 24, str. 675-680

[16]-

<http://www.faf.cuni.cz/studium/Materialy/Katedra%20analytické%20chemie/Zdravotnická%20bioanalytika/Speciální%20instrumentální%20metody/Přednášky/Neseparační%20průtokové%20metody.pdf> (13.8.2010)

[17]- http://users.prf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/prutok_anal.htm (13.8.2010)

[18]-

<http://www.faf.cuni.cz/studium/Materialy/Katedra%20analytick%C3%A9%20chemie/Zdravotnick%C3%A1%20bioanalytika/Speci%C3%A1ln%C3%AD%20instrument%C3%A1ln%C3%AD%20metody/P%C5%99edn%C3%A1ky/Elektroanalytick%C3%A9%20metody.pdf> (14.8.2010)

- [19]- Raluca-Ioana S., Jacobus F. van Staden, Hassan Y. Aboul-enein, Vusimuzi Mulaudzi L.- On-line simultaneous determination of S- and R- perindopril using amperometric biosensors as detectors in flow systems. *Anal. Chim. Acta*, 2002, roč. 476, str. 189- 195
- [20]- Raluca-Ioana S., Jacobus F. van Staden, Hassan Y. Aboul-enein- Determination of S-perindopril using a flow injection system with an amperometric biosensor. *Sens. Actuators, B*, 1999, roč. 54, str. 261-265
- [21]- Alarfaj N.A.A.-Chemiluminescence determination of enalapril maleate in pharmaceuticals and biological fluids using tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)- *Anal. Sci.*, 2003, roč. 19., č. 8, str. 1145-1149, použit abstrakt databáze ScienceDirect
- [22]- www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf (18.8.2010)
- [23]- Abdellatef H.E., Avad M.M., Taha E.A.- Spectrophotometric and atomic absorption spectrometric determination of ramipril and perindopril through ternary complex formation with eosin and Cu(II)- *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, roč. 18, č. 6, str 1021-1027, použit abstrakt
- [24]- Ayad M.M., Shalaby A.A., Abdellatef H.E., Hosny M.M.- Spectrophotometric and AAS determination of ramipril and enalapril through ternary complex formation- *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, roč. 28, č. 2, str. 311-321, použit abstrakt databáze Web of Science
- [25]- Hishman E. Abdellatef- Utility of certain π -acceptors for the spectrophotometric determination of perindopril, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, roč. 17, str. 1267-1271
- [26]- Nafisur R., Nishat A., Mohammad K.- Optimized and validated initial-rate method for the determination of perindopril erbumine in tablets- *Chem. Pharm. Bull.*, 2006, roč. 54, č. 1, str. 33-36