

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**Katedra analytické chemie**

**PŘEHLED ANALYTICKÝCH METOD PRO STANOVENÍ STATINŮ**  
**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Vedoucí bakalářské práce: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.**

**Vedoucí katedry: prof. RNDr. Petr Solich Csc.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2015**

**Lucie Roubíčková**

## Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Lucie Roubíčková

Školitel: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název bakalářské práce:

### **Přehled analytických metod pro stanovení statinů**

Tato bakalářská práce se zabývá přehledem analytických metod pro stanovení statinů a jejich metabolitů. V rámci práce byly vybrány tři statiny, které jsou řazeny mezi novější a velmi účinná léčiva. Jedná se o rosuvastatin, atorvastatin, pitavastatin a jejich metabolity. Tyto statiny jsou používány v klinické léčbě a mají minimální riziko vedlejších účinků. Pitavastatin je zatím používán pouze v Japonsku. Tato práce byla především zaměřena na vývoj nejnovějších analytických metod pro stanovení statinů od roku 2008 až po současnost.

V bakalářské práci jsou zahrnuty informace o obecné charakteristice statinů a o struktuře a vlastnostech tří vybraných statinů. Dále jsou popsány moderní směry v oblasti kapalinové chromatografie, zejména UHPLC, moderní trendy ve stacionárních fázích a v detekci. Praktické aspekty bioanalytických metod jsou také obecně diskutovány.

Bakalářská práce byla sepsána formou rešeršní práce. Informace obsažené v této práci byly čerpány z odborných článků, které jsou k dispozici na vědeckých portálech. Z vybraných článků jsou vytvořeny přehledné tabulky s důležitými poznatky o způsobu analýzy vybraných tří statinů. V tabulkách jsou zahrnuty údaje o použitém analyzovaném materiálu, stacionární a mobilní fázi, způsobu detekce analytického vzorku a citlivosti dané analytické metody.

**Klíčová slova:** atorvastatin; *o*-hydroxyatorvastatin; *p*-hydroxyatorvastatin; atorvastatin lakton; pitavastatin; pitavastatin lakton; rosuvastatin; rosuvastatin lakton; HPLC; UHPLC; bioanalytické metody

## Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Lucie Roubíčková

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

The title of Thesis :

### **An overview of analytical methods for the determination of statins**

This thesis deals with an overview of analytical methods for the determination of statins and their metabolites. Three statins, which are among the newest and the most commonly used drugs in clinical practice were selected, including rosuvastatin, atorvastatin, pitavastatin, and their metabolites. These are the statins, which have a minimal risk of side effects. Pitavastatin is currently used only in Japan. This thesis was focused on the development of the newest analytical methods for the determination of statins since 2008 to the present.

The thesis includes information about the general characteristics of statins, and information about the structure and properties of three selected statins. It further describes the modern trends in the field of liquid chromatography, especially UHPLC, modern trends in stationary phases and detection. Practical aspects of bioanalytical methods are also widely discussed.

This thesis was written in the form of Review work. The information contained in this work was acquired from the scientific articles, which are available at the scientific portals. Using selected articles, summary tables were created containing key findings on the analytical methods for selected three statins. The summary tables include information about the analyzed material, stationary and mobile phase, detection method and the sensitivity of the analytical method.

**Keywords:** atorvastatin; *o*-hydroxyatorvastatin; *p*-hydroxyatorvastatin; atorvastatin lactone; pitavastatin; pitavastatin lactone; rosuvastatin; rosuvastatin lactone; HPLC; UHPLC; bio-analytical methods

„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. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 14. 5. 2015

.....

Lucie Roubíčková

Děkuji doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, cenné rady, které mi poskytovala po celou dobu psaní této práce, připomínky a čas, který mi věnovala.

## Obsah

Abstrakt.....	2
Abstract.....	3
Obsah.....	6
Seznam zkratek.....	8
1. Úvod.....	11
2. Cíl a zadání bakalářské práce.....	12
3. Obecná charakteristika statinů.....	13
3.1 Využití statinů.....	13
3.2 Nežádoucí účinky statinů.....	13
3.3 Vývoj statinů.....	14
3.4 Farmakokinetika statinů.....	15
4. Struktura a fyzikálně - chemické vlastnosti vybraných statinů.....	15
4.1 Struktura vybraných statinů.....	15
4.1.1 Atorvastatin.....	16
4.1.2 Rosuvastatin.....	17
4.1.3 Pitavastatin.....	17
4.2 Přehled fyzikálně chemických vlastností vybraných statinů.....	18
4.3 Interkonverze laktonové a hydroxykyselinové formy statinů.....	19
5. Moderní směry v kapalinové chromatografii.....	20
5.1 Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC - ultra-high performance liquid chromatography ).....	20
5.2 Moderní trendy ve stacionárních fázích.....	21
5.3 Moderní trendy v chromatografické detekci.....	22
6. Bioanalytické metody.....	23
6.1 Příprava biologického materiálu.....	24
6.2 Chromatografická separace v bioanalytických metodách.....	25
6.3 Citlivá a selektivní detekce v bioanalytických metodách.....	25
7. Validace analytických metod.....	27
7.1 Validační parametry.....	28
7.2 Stabilita statinů.....	29

8. Analytické metody pro stanovení statinů.....	30
8.1 Atorvastatin.....	30
8.2 Rosuvastatin.....	34
8.3 Pitavastatin.....	38
9. Závěr.....	41
Seznam použité literatury.....	42

## Seznam zkratek

ACN – acetonitril

AML – amlodipin

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

AT – atorvastatin

ATL – atorvastatin lakton

BEH – hybridní stacionární fáze založená na ethylenových můstcích

C8 – oktylsilyl

C18 – oktadecylsilyl

CAD – detektor nabitého aerosolu

DS – diklofenak sodný

ESI – ionizace elektrosprejem

ESI<sup>+</sup> – ionizace elektrosprejem v pozitivní módu

ESI<sup>-</sup> – ionizace elektrosprejem v negativním módu

EZE – ezetimib (používá se v kombinované léčbě se statiny)

ELSD – odpařovací detektor rozptylu světla

EMA – Evropská léková agentura (European Medicines Agency)

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léků (Food and drug administration)

FEN – fenofibrát

FL – fluvastatin

GLI – glimepirid

GLIQ – gliquidon

HMG-CoA – 3-hydroxy-3-methylglutaryl- koenzym A

HDL – lipoprotein o vysoké hustotě

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC-MS/MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

HPLC/PDA – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole

HPLC/UV – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s ultrafialovou detekcí

HQC – vzorek kontroly kvality, vysoká koncentrace

HRMS – hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením



ICH – Mezinárodní konference pro harmonizaci technických požadavků pro registraci humánních léčivých přípravků (International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use)

LDL – lipoprotein o nízké hustotě

LLE – extrakce z kapaliny do kapaliny

LOD – limit detekce

LV – lovastatin

LVA – lovastatin hydroxykyselina

LOQ – limit kvantifikace

LQC – vzorek kontroly kvality, nízká koncentrace

$m/z$  – poměr hmotnosti a náboje

MeOH – methanol

MET – metformin

MQC – vzorek kontroly kvality, střední koncentrace

MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

*o*-OH AT – ortho-hydroxyatorvastatin

PDA, DAD – detektor diodového pole

*p*-OH AT – para-hydroxyatorvastatin

PT – pitavastatin

PTL – pitavastatin lakton

PV – pravastatin

QqQ – trojitý kvadrupól

Q-TOF – spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu

RV – rosuvastatin

RVL – rosuvastatin lakton

SIM – monitorování vybraného iontu

SPE – extrakce na pevné fázi

SRM – monitorování vybrané reakce

SV – simvastatin

SVA – simvastatin kyselina

TEA – triethylamin

THF – tetrahydrofuran

TM – timolol maleát

TOF – analyzátor doby letu

UHPLC – ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UHPLC-MS/MS – ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou  
hmotnostní detekcí

ULOQ – horní mez stanovitelnosti

UV/ VIS detekce – detekce v ultrafialové a viditelné oblasti

## 1. Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá přehledem analytických metod, které slouží pro stanovení statinů. Byly vybrány tři hlavní zástupci statinů: atorvastatin, rosuvastatin a pitavastatin. Tyto statiny se vyznačují vysokou účinností v léčbě pacientů s hypercholesterolemií a mají dlouhý biologický poločas, tudíž mohou být podávány i během dne. Pitavastatin je na trhu zatím pouze v Japonsku, ale jedná se o velmi nadějně léčivo, jelikož je minimálně metabolizován pomocí cytochromu P450 2C9 izoenzymem. Tato práce navazuje na vědecký článek z roku 2008 autorského kolektivu L. Nováková, D. Šatínský a P. Solich, který je přehledem o HPLC metodách pro stanovení simvastatinu a atorvastatinu. Právě od roku 2008 až po současnost byly vyhledávány články, které se týkaly analytického stanovení tří vybraných statinů.

Statiny jsou léčiva, která vedou ke snižování hladiny cholesterolu v krvi. Je to zapříčiněno blokadou enzymu 3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A reductázy, který zodpovídá za syntézu cholesterolu. Statiny se vyskytují ve dvou formách, a to v laktonové formě a ve formě otevřené hydroxykyseliny, přičemž hydroxy forma je aktivní formou léčiva in vivo, a naopak laktonová forma je neaktivní in vivo (proléčivo). Při stanovení statinů často dochází k interkonverzi mezi těmito dvěma formami. Proto je třeba této interkonverzi zamezit zvolením vhodných podmínek v průběhu celé analýzy.

Stanovení statinů prochází neustálým zdokonalováním analytických metod, a to zejména chromatografických metod. V současné době je využíváno spojení HPLC s UV detekcí nebo s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Do popředí se dostává UHPLC ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Tato metoda je řazena mezi citlivější metody a umožňuje rychlejší analýzu, než tomu bylo u starších metod. Zmíněné přednosti jsou využívány při stanovení statinů především proto, že statiny jsou v biologickém materiálu přítomny ve velmi nízkých koncentracích.

## 2. Cíl a zadání bakalářské práce

Předložená bakalářská práce je zpracována formou rešeršní práce. Cílem této práce je sbírat informace z odborných článků a publikací, které se zabývají stanovením statinů pomocí metod kapalinové chromatografie. Bakalářská práce se zabývá stanovením atorvastatinu, pitavastatinu a rosuvastatinu, které jsou stanovovány zejména pomocí chromatografických metod (HPLC a UHPLC) ve spojení s vhodnou detekcí. V této práci jsou sbírány informace v oblasti stanovení statinů od roku 2008 až po současnost. V roce 2008 byl sepsán odborný článek o přehledu HPLC metod pro stanovení simvastatinu a atorvastatinu od kolektivu autorů L. Nováková, D. Šatínský a P. Solich [1]. Na tento přehled se bakalářská práce snaží navázat a udělat podobný přehled analytických metod, kterými jsou stanovovány zmíněné statiny.

V úvodní části bakalářské práce jsou zmíněny obecné informace o statinech a popsány moderní trendy v oblasti kapalinové chromatografie a bioanalytické metody. Poté byly hledány informace ve vědeckých článcích a následně z nich byly zhotoveny přehledné tabulky pro každý statin zvlášť. Mezi hodnocené parametry patří: analyzovaný materiál, analytická metoda pro stanovení statinu, stacionární a mobilní fáze, způsob detekce, čas a parametry citlivosti metody (LOD a LOQ).

### **3. Obecná charakteristika statinů**

Statiny jsou řazeny mezi hypolipidemika. Jedná se o skupinu léčiv, která snižují hladinu cholesterolu v krvi. Jde o specifické, kompetitivní inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reductázy (HMG-CoA). Tento enzym je klíčovým enzymem endogenní syntézy cholesterolu. Inhibice HMG-CoA vede k blokaci syntézy mevalonátu v biosyntetické dráze cholesterolu, a tím dojde ke snížení hladiny cholesterolu v krvi [1].

#### **3.1 Využití statinů**

Statiny jsou aplikovány pro snižování celkového cholesterolu a lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) v lidském organismu, což má za následek snižování rizika aterosklerózy i ostatních kardiovaskulárních onemocnění. Statiny dále zvyšují hladinu protektivního lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL) a snižují hladinu triglyceridů v krvi. Statiny mají také antiagregační a protizánětlivé účinky [1][2].

Ateroskleróza je charakteristická ukládáním cholesterolu do stěny arterie, nejčastěji do koronární arterie nebo aorty. Ateroskleróza je nejčastější příčinou infarktu myokardu [1][2].

Statiny jsou využívány především k léčbě hypercholesterolemie. Jedním z typů je familiární hypercholesterolemie, která patří mezi autosomálně dominantně dědičná onemocnění. Dochází k mutaci genu kódujícího LDL receptor, čímž dojde k poškození LDL receptoru, a je tak blokován vstup LDL cholesterolu do buněk. Zároveň dochází ke zvýšení hladiny cholesterolu v krvi. Zde mají statiny sníženou účinnost, protože dochází ke zkrácení nebo ztrátě alely pro LDL receptor. Mezi další onemocnění, která jsou léčena statiny, jsou řazeny izolovaná hypercholesterolemie a smíšená dyslipidémie. Statiny mohou být využity i k prevenci kardiovaskulárních onemocnění [1][2][3].

#### **3.2 Nežádoucí účinky statinů**

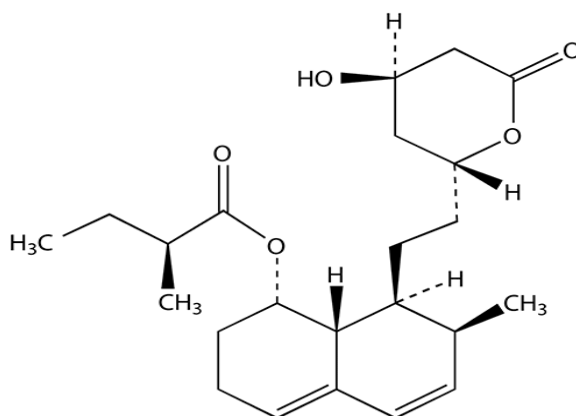
Statiny patří mezi většinou bezproblémová léčiva, ale mohou se objevit jednak běžné nežádoucí účinky jako jsou bolesti hlavy nebo gastrointestinální potíže, a nebo i komplikovanější nežádoucí účinky jako jsou myopatie, která se vyznačuje bolestí svalů, nebo nebezpečnější rhabdomyolýza. Při rhabdomyolýze dochází ke svalovému selhání, což se projeví uvolněním myoglobinu do cirkulace, dojde k hnědému zabarvení moče

a později až k selhání ledvin. Rhabdomyolýza byla častým nežádoucím účinkem u cerivastatinu, který byl proto stažen z trhu [1][3].

Terapeutické monitorování lékových hladin je významné pro zjištění přesné plazmatické koncentrace statinů v biologickém materiálu a pro kontrolu vhodné dávky léčiva. Zároveň jsou minimalizovány nežádoucí účinky a je zachováno snižování hladiny celkového cholesterolu. Terapeutické monitorování léčiv se však nepoužívá u každého pacienta léčeného statiny, ale pouze u pacientů, kteří trpí svalovými bolestmi nebo slabostmi. Ke stanovení léčiva v biologickém materiálu jsou nejčastěji používány separační metody jako vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s vhodným detektorem (UV/VIS detekce nebo hmotnostní spektrometrie). Úprava vzorků před vlastní analýzou je pro monitorování lékových hladin klíčová. Hlavní cíl spočívá v převedení složité matrice na vzorek vhodný k analýze. Terapeutické rozmezí statinů se pohybuje typicky kolem 10-80 mg za den [1][2].

### 3.3 Vývoj statinů

Mevastatin je považován za první objevený statin. Jeho molekula byla izolována z houby *Penicillium citrinum* v roce 1973. Mevastatin má řadu nežádoucích účinků a je toxický, proto nikdy nebyl použit v praxi. Struktura mevastatinu byla využita jako prekurzorová molekula pro přípravu dalších statinů. Obrázek číslo 1 znázorňuje chemickou strukturu mevastatinu [1][2][3].



Obr. 1: Chemická struktura mevastatinu [2].

V současnosti je využívána umělá syntéza nebo izolace statinů, které jsou již používány jako léčiva. Mezi uměle syntetizované statiny patří atorvastatin, rosuvastatin a pitavastatin, které obsahují shodnou fluorofenylovou skupinu a všechny se vyskytují ve formě otevřené hydroxykyseliny. Naopak, přirozeným statinem je lovastatin. Polosyntetický simvastatin a pravastatin jsou produkovány z lovastatinu a mevastatinu. Všechny syntetické statiny se vyskytují ve formě otevřené kyseliny. V současnosti narůstá spotřeba statinů, a to nejvíce atorvastatinu a rosuvastatinu, protože se jedná o účinnější formy statinů [1][3].

### **3.4 Farmakokinetika statinů**

Statiny existují ve dvou formách, laktonové a otevřené hydroxy kyseliny. Otevřená forma hydroxy kyseliny je aktivním léčivem in vivo, která snižuje hladinu cholesterolu v krvi. Naopak, laktonová forma statinů je in vivo neaktivní (proléčivo). Laktonová forma se absorbuje v gastrointestinálním traktu. V játrech a v nehepatických tkáních je pak přeměněna na aktivní formu léčiva. V závislosti na chemické struktuře mají statiny rozdílnou afinitu k HMG-CoA reduktáze. K metabolizaci dochází pomocí různých isoformů cytochromu P450 [1][3][4].

Chemická struktura určuje farmakologické účinky a farmakokinetické vlastnosti, jako jsou tkáňová distribuce nebo metabolická stabilita. Lovastatin a simvastatin nemají příliš dlouhý biologický poločas, proto jsou podávány nejčastěji večer nebo na noc, kdy je aktivita HMG-CoA reduktázy největší. Naopak, novější statiny, jako rosuvastatin a atorvastatin mají, delší biologické poločasy, proto mohou být podávány i během dne [1][3][4].

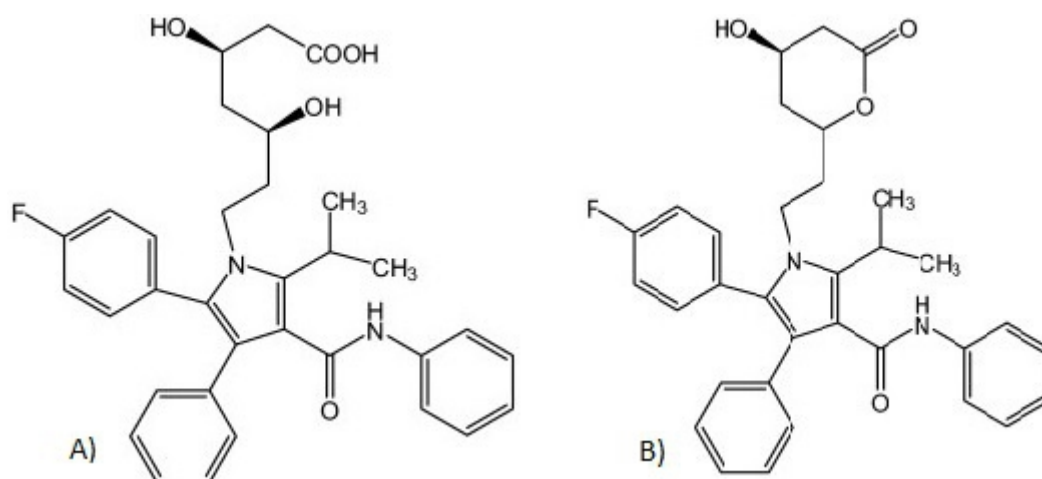
## **4. Struktura a fyzikálně - chemické vlastnosti vybraných statinů**

### **4.1 Struktura vybraných statinů**

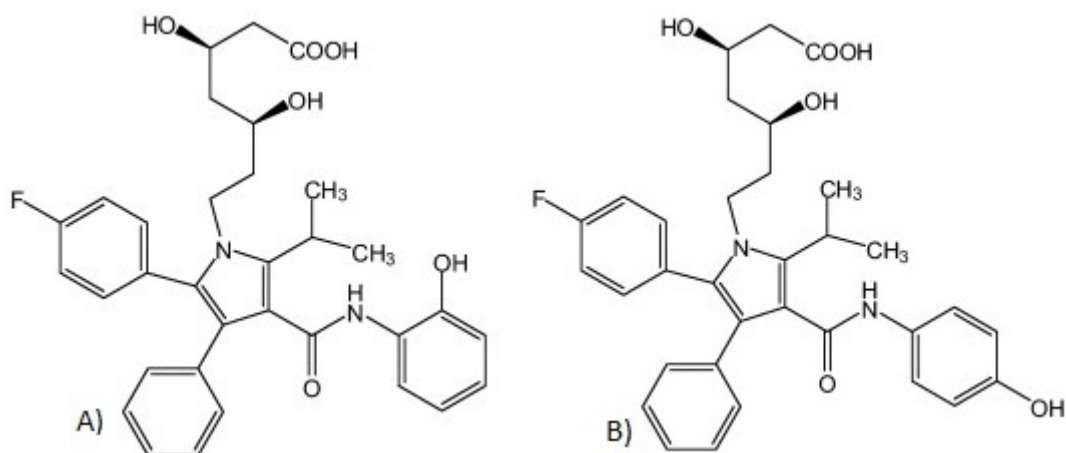
Rozdílná chemická struktura statinů způsobuje různou afinitu k enzymu HMG-CoA reduktáze. To je určující pro farmakologické účinky statinů a pro rozdílné farmakokinetické vlastnosti, jako jsou tkáňová distribuce, metabolická stabilita nebo transportéry podílející se na jejich metabolismu [1].

#### 4.1.1 Atorvastatin

Molekulu atorvastatinu (AT) tvoří 3,5-dihydroxyvalerová kyselina, která je připojena na pyrrolové jádro. Atorvastatin je podáván ve formě otevřené hydroxykyseliny, přímo v aktivní formě léčiva. Jedná se o lipofilní léčivo. Jeho absorpce probíhá v gastrointestinálním traktu a podstupuje rozsáhlý metabolismus v játrech. Metabolismus v játrech poskytuje dvě aktivní hydroxyformy atorvastatinu (ortho-hydroxyatorvastatin a para-hydroxyatorvastatin), tři neaktivní laktonové formy (ATL) a laktony hydroxy derivátů. Atorvastatin je z těla odváděn ve formě žluči stolicí nebo močí. Na obrázcích číslo 2 a 3 jsou znázorněny chemické struktury atorvastatinu a jeho metabolitů [5][6][7].



Obr. 2: Chemická struktura atorvastatinu (A) a atorvastatinu laktonu (B) [7].

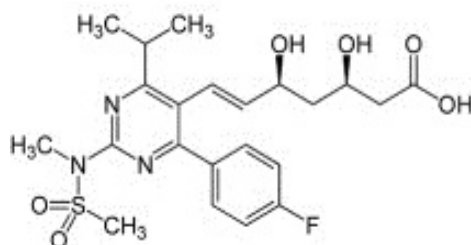


Obr. 3: Chemická struktura *o*-OH atorvastatinu (A) a *p*-OH atorvastatinu (B) [7].



#### 4.1.2 Rosuvastatin

Rosuvastatin (RV) je hydrofilní léčivo, které je podáváno v aktivní formě otevřené hydroxy kyseliny. Je řazen mezi nejméně lipofilní statiny. Rosuvastatin má dva metabolity, a to rosuvastatin lakton a N-desmethylrosuvastatin. Základ aromatické struktury rosuvastatinu tvoří pyrimidin. Rosuvastatin má ve své struktuře jako jediný ze statinů methylsulfoamidovou skupinu. Může nejvíce blokovat enzym HMG-CoA reductázu, protože umožňuje nejvyšší počet vazebných interakcí s tímto enzymem. Další velká výhoda rosuvastatinu je jeho vysoká hydrofilita, tudíž může být selektivně vychytáván jaterními buňkami, což umožňuje minimalizaci negativních účinků na příčně pruhovanou svalovinu. Obrázek číslo 4 znázorňuje chemickou strukturu rosuvastatinu [4][6][8].



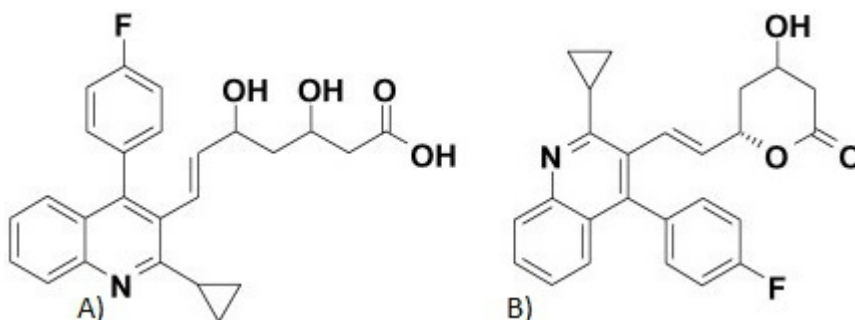
Obr. 4: Chemická struktura rosuvastatinu [8].

#### 4.1.3 Pitavastatin

Pitavastatin (PT) je plně syntetický statin, který se vyskytuje v hydroxyformě. Pitavastatin má jeden metabolit v podobě pitavastatinu laktonu (PTL). Pitavastatin má charakteristickou skupinu 3,5-dihydroxyvalerovou kyselinu připojenou na chinolinu. Kromě toho, že výrazně snižuje hladinu LDL v krvi, zároveň zvyšuje hladinu protektivního HDL v krvi. Pitavastatin také snižuje riziko vedlejších účinků, které mají negativní vliv na svalové funkce. Další předností pitavastatinu je minimální metabolizace pomocí cytochromu P450 izoenzymem 2C9, a tudíž menší množství lékových interakcí v případě polyfarmakoterapie. Hlavní metabolická cesta pitavastatinu zahrnuje glukuronidaci pomocí UDP-glukuronyltransferázy a následně spontánní laktonizaci eliminací glukuronidované skupiny. Navíc, laktonová forma může být nevratně převedena na aktivní léčivo. Pitavastatin je z těla vylučován žlučí

enterohepatální cirkulací [9][10].

Jedná se o nejnovější statin, který je zatím k dispozici na trhu pouze v Japonsku, ale pomalu se dostává i do Evropy, USA a Asie. Obrázek číslo 5 znázorňuje chemickou strukturu pitavastatinu a jeho laktonové formy [10].



Obr. 5: Chemická struktura pitavastatinu (A) a pitavastatinu laktonu (B) [10].

## 4.2 Přehled fyzikálně chemických vlastností vybraných statinů

**Tabulka 1.:** Přehled fyzikálně chemických vlastností vybraných statinů dle [3]

Název	Sumární vzorec	Průměrná molekulová hmotnost	pKa	log P
Atorvastatin	$C_{33}H_{35}FN_2O_5$	558,64	$4,29 \pm 0,10$	$3,85 \pm 0,73$
Atorvastatin lakton	$C_{33}H_{33}FN_2O_4$	540,2	$13,39 \pm 0,40$	$3,90 \pm 0,72$
<i>o</i> -Hydroxyatorvastatin	$C_{33}H_{35}FN_2O_6$	574,64	$4,29 \pm 0,10$	$4,10 \pm 0,75$
<i>p</i> -Hydroxyatorvastatin	$C_{33}H_{35}FN_2O_6$	574,64	$4,29 \pm 0,10$	$3,21 \pm 1,05$
Pitavastatin	$C_{25}H_{24}FNO_4$	421,46	$4,24 \pm 0,10$	$1,92 \pm 0,76$
Pitavastatin lakton	$C_{25}H_{22}FNO_3$	403,45	$13,25 \pm 0,40$	$2,23 \pm 0,71$
Rosuvastatin	$C_{22}H_{28}FN_3O_6S$	481,54	$4,25 \pm 0,10$	$0,89 \pm 0,67$
Rosuvastatin lakton	$C_{22}H_{26}FN_3O_5S$	463,52	$13,22 \pm 0,40$	$1,20 \pm 0,65$
N-Desmethylrosuvastatin	$C_{21}H_{26}FN_3O_6S$	467,51	$4,25 \pm 0,10$	$0,74 \pm 0,67$

Tabulka číslo 1 zahrnuje fyzikálně chemické vlastnosti atorvastatinu, pitavastatinu, rosuvastatinu a jejich derivátů. Jejich průměrná molekulová hmotnost se pohybuje okolo 400-580. Statiny ve formě kyselin mají pKa v rozmezí 4,0 - 4,3, tudíž se řadí mezi slabé kyseliny. Naopak, statiny nacházející se ve formě laktonu mají kyselost výrazně sníženou kvůli chybějícímu vodíku, který je přítomen v karboxylové skupině u kyselých forem. pKa laktonových forem se pohybuje kolem hodnot 13 - 14. Nejvíce

hydrofilním statinem je rosuvastatin, jehož log P se nachází kolem hodnoty 0,89. Naopak nejvíce lipofilní je atorvastatin a jeho formy mající log P mezi hodnotami 3 - 4.

### **4.3 Interkonverze laktonové a hydroxykyselinové formy statinů**

Interkonverze se může vyskytovat u různých druhů léčiv, které podstupují náročný proces během bioanalytického hodnocení. Interkonverze různých tříd léčiv může nastat ještě dříve než dojde k odseparování zkoumaného analytu od biologické matrice. Například k ní může docházet při extrakci nebo při odpařování do sucha. Velmi často interkonverze nastane v případě použití hmotnostního spektrometru v první části přístroje v iontovém zdroji [1].

Interkonverzi často podléhají laktonová a hydroxykyselinová forma inhibitorů HMG-CoA reduktázy. Vliv interkonverze lze minimalizovat zvolením vhodných podmínek bioanalytické metody. Nejdůležitějším faktorem je vhodné pH [1].

Například atorvastatin je podáván ve formě otevřené hydroxykyseliny, ale po podání této lékové formy mohou biologické vzorky obsahovat kromě otevřené hydroxy formy i laktonovou formu [1].

Pro minimalizaci interkonverze mezi těmito dvěma formami by mělo pH být v rozmezí 4 - 5. Zvýšení hodnoty pH nad 6 může způsobit přeměnu hydroxykyseliny na laktonovou formu. Naopak, snížení pH má za příčinu přeměnu laktonu na kyselinu v neionizované formě a nebo i přeměnu kyseliny na lakton. Někdy i nastavené optimální podmínky nemohou zcela zamezit interkonverzi. Proto je nezbytné, aby bylo navrženo vhodné složení standardů kalibrační řady a vzorků pro kontrolu kvality [1].

Vývoj metody pro kvantifikaci dvou analytů, které mohou podléhat interkonverzi, by měl zahrnovat optimalizaci podmínek zamezujících interkonverzi jako první krok. Druhý krok by měl být zaměřen na zvolení vhodného složení kontrolního vzorku a na složení standardních vzorků, které by měly pokrýt celý koncentrační rozsah složení reálného vzorku [1].

## 5. Moderní směry v kapalinové chromatografii

Hlavním požadavkem na moderní trendy v oblasti kapalinové chromatografie je především zrychlení separace, zvyšování separační účinnosti, rozlišení či zvýšení citlivosti [11].

### 5.1 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC - ultra-high performance liquid chromatography )

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie je chromatografická metoda, která vyniká vysokou separační účinností, a to zejména díky využití částic menších než 2  $\mu\text{m}$ . Optimální separační účinnosti je dosaženo při vyšších lineárních průtokových rychlostech. Kvůli nízkému odporu proti převodu hmoty je dosaženo zachování vysoké účinnosti v širším rozsahu lineárních průtokových rychlostí. Díky tomu jsou částice menší než 2  $\mu\text{m}$  používány k získání lepší účinnosti, rozlišení píků a zkrácení doby analýzy. Účinnost částic menších než 2  $\mu\text{m}$  umožňuje zkrácení délky analytické kolony [11].

Zmenšení částic při chromatografické analýze má též i nevýhody, protože zároveň dochází ke zvyšování zpětného tlaku v chromatografickém systému. Proto UHPLC pracuje za vysokých tlaků okolo 100 Mpa [11].

Instrumentace UHPLC musí umožňovat práci za vysokých tlaků a splňovat i další požadavky. V UHPLC instrumentaci by nemělo chybět robustní čerpadlo a dávkovací systém. Další podmínkou je přesné dávkování velmi malých objemů. Kvalitní systém UHPLC systém musí též mít co nejmenší zpoždění gradientu a minimální mimokolonové objemy. Dalším požadavkem u UHPLC instrumentace je vysoká frekvence sběru dat, která by měla dosahovat > 20 Hz i více [11].

Stacionární fáze v UHPLC by měla být vyrobena z kvalitního a stabilního materiálu, který je schopný umožnit rychlou a účinnou separaci probíhající za vysokého tlaku. Stacionární fáze pro UHPLC vyniká zejména vysokou mechanickou a chemickou stabilitou. Vývoj nových UHPLC stacionárních fází je spojován se zavedením nových modifikací pro dosažení odlišné selektivity separace. Základní materiál UHPLC stacionárních fází je tvořen silikagelem nebo hybridním materiálem. Velikost částic používaných v UHPLC separaci se pohybuje v rozmezí 1,5 – 2,0  $\mu\text{m}$ . Kolony dosahují

délek od 50 – 150 mm s vnitřním průměrem okolo 2,1 mm [11].

Jako detektory v UHPLC jsou používány detektory podobné jako v HPLC. Zejména se jedná o detektory typu UV/VIS spektrofotometrického detektoru, fluorescenčního detektoru, hmotnostního spektrometru, detektor s diodovým polem nebo odpařovací detektor rozptylu světla [2][11].

## 5.2 Moderní trendy ve stacionárních fázích

Pokroky v chromatografické analýze vedou k vyšším požadavkům na vlastnosti stacionárních fází. Mezi tyto požadavky se řadí vysoká účinnost separace, kterou ovlivňuje délka kolony a velikost částice, rychlost průtoku mobilní fáze nebo teplota a viskozita. Dále by stacionární fáze měla mít vhodnou selektivitu, a to právě ovlivní změna složení stacionární a mobilní fáze nebo změna rychlosti průtoku mobilní fáze. Mezi další nezbytné požadavky na nové typy stacionárních fází patří především chemická stabilita, která spočívá ve větší odolnosti při vyšším pH, tepelná a mechanická stabilita. Mechanická stabilita je zaměřena především na odolnost vůči vysokým tlakům. Stacionární fáze by měla umožňovat také použití 100 % vodných mobilních fází [11].

Moderním trendem v oblasti stacionárních fází jsou hybridní stacionární fáze, které spojují výhody silikagelu, jako jsou vysoká účinnost separace a mechanická odolnost s výhodami polymeru, který vyniká chemickou a teplotní stabilitou. Proto je pro hybridní stacionární fáze charakteristická chemická, tepelná a mechanická stabilita do 100 Mpa. Důvodem vyšší stability je záměna polárních hydroxyskupin za methylenové skupiny [11].

Stacionární fáze na bázi porézního grafitového uhlíku jsou vyráběny z vysoce inertního materiálu, který je složen z grafitových proužků. Výhoda této stacionární fáze spočívá opět ve stabilitě v celém rozsahu pH a teplotní odolnosti do 200°C. Grafitový uhlík je zařazen mezi velmi silné adsorbenty. Například při použití vodně-organické mobilní fáze dojde k silnému zadržení velkých molekul. Stacionární fáze na bázi porézního grafitového uhlíku umožňuje separaci chirálních analytů a strukturálních izomerů [11].

Dalším moderním typem stacionárních fází jsou monolitické kolony tvořené jedním kusem porézního materiálu, který vyplňuje vnitřní část separační kolony. Jejich

velkou výhodou je umožnění snížení pracovního tlaku při zachování dobré separační účinnosti, která je způsobena zvýšeným převodem hmoty. Účinnost monolitu je závislá na vlastní struktuře monolitu a na velikosti pórů. Mezi výhody monolitu patří snadná příprava a vyšší permeabilita. Monolitické kolony obsahují dva typy pórů: makropóry a mesopóry. Makropóry mají za úkol zrychlovat převod molekul mezi mobilní a stacionární fází. Dále makropóry zajišťují rychlý konvektivní tok mobilní fáze skrz monolit. Mesopóry zajišťují veliký povrch, a tím zvyšují separační kapacitu. Proto monolitické kolony mohou být použity při velmi vysokých průtokových rychlostech [11].

### 5.3 Moderní trendy v chromatografické detekci

Stejně jako jsou zvyšovány požadavky na stacionární fáze, dochází ke zvýšení nároků na detektory chromatografického systému. Detektor by měl zejména vynikat vysokou citlivostí, rychlou odezvou a měřit v širokém rozmezí koncentrací. Další podmínkou by měla být odolnost vůči změnám mobilní fáze [18].

Detektory na bázi aerosolu jsou řazeny mezi velmi univerzální detektory, které mají tu výhodu, že mohou detekovat jakékoliv látky bez ohledu na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Další výhodou je snadné ovládání zařízení. Detektory mají i řadu nevýhod, mezi které patří závislost odpovědi detektorů na složení mobilní fáze, což je podstatné zejména u gradientové eluce. Mezi další nevýhody je řazeno nemožnost získání spektrálních dat, tudíž nedochází k potvrzení identity píku nebo vyhodnocení čistoty píku. Tyto detektory fungují na podobném principu v prvním kroku procesu detekce, kdy dochází ke zmlžení pomocí proudu dusíku a k tvorbě jemných kapek aerosolu. V další fázi nastává odpaření mobilní fáze. Moderní univerzální detektory na bázi aerosolu se liší finální fází detekce. Mezi detektory na bázi aerosolu patří detektor založený na měření rozptylu světla (evaporative light scattering detector = ELSD), detektor nabitého aerosolu (charged aerosol detector = CAD) a nano quantity analyte detektor (NQAD). Aerosolové detektory jsou využívány při analýze netěkavých, neutrálních, kyselých, bazických nebo amfotermních látek [11].

Dalším moderním typem detektoru je detektor s diodovým polem, jehož výhodou je snímání celého absorpčního spektra v závislosti na čase bez přerušení chromatografické separace. Další předností je umožnění porovnání snímaných spekter

s knihovnou spekter, identifikace analytů a možnost výpočtu čistoty píku, která dokáže určit, zda v píku eluuje jedna látka či jde o směs nerozdělených analytů [11].

## 6. Bioanalytické metody

Bioanalytické metody zahrnují několik kroků, které jsou důležité pro dosažení spolehlivých výsledků v komplexní biomatrici. První krok spočívá v odebrání alikvotu vzorku pro analýzu. Poté následuje extrakční proces, přečištění vzorků, efektivní chromatografická analýza, citlivá a selektivní detekce. Chromatografické metody, obzvláště kapalinová chromatografie, jsou metodami volby v bioanalytických laboratořích. V poslední době je rozšířena analytická metoda UHPLC, zejména protože poskytuje rychlé separace. Zásadní výhody UHPLC spočívají v rychlejší analýze, vyšší separační účinnosti, vyšší citlivosti, a také v nižší spotřebě rozpouštědel oproti konvenční HPLC. Mezi UHPLC separací a konvenční přípravou vzorku je však velký rozdíl z hlediska časové náročnosti, a proto je třeba metody pro přípravu vzorku dále vyvíjet a optimalizovat [12][13].

Bioanalytické metody jsou často využívány ke stanovení různých tříd léčiv v biologickém materiálu. Jedná se o velmi důležitý krok ve vývoji nových léčiv, protože poskytuje farmakokinetické informace o daném léčivu. Dále je možné analytickými metodami zjistit vhodnou terapeutickou dávku stanovovaného léčiva bez toho, aniž by způsobila nežádoucí účinky vlivem nevhodně zvolené terapeutické dávky. Dále je bioanalytickými metodami zjišťován druh léčiv a jejich metabolitů ve forenzní analýze. V poslední době je také aktuální sledování farmak v životním prostředí, jako jsou odpadní nebo povrchové vody [12][13].

Na bioanalytické metody je kladeno mnoho požadavků, jelikož dochází ke zvyšování počtu biologických vzorků, které potřebují rychlou kvantitativní analýzu. Je to zapříčiněno nízkou biologickou dostupností mnoha léčiv, a tudíž nízkou koncentrací léčiva ve vzorku. Proto jsou vyvíjeny rychlé, účinné a citlivé bioanalytické metody. Bioanalytická metoda, která je vhodná pro zamýšlený účel, by měla splňovat požadavky pro validaci metody, jako jsou správnost, přesnost, selektivita, citlivost, reprodukovatelnost a stabilita. Velmi často je pro tyto účely využívána separační metoda HPLC-MS/MS. HPLC metoda je schopna oddělit poměrně složité směsi s nízkou

a s vysokou molekulovou hmotností sloučenin, stejně tak dokáže oddělit rozdílně polární látky a látky s různými acidobazickými vlastnostmi v různých matricích vzorku. Na úkor těchto předností musí HPLC obětovat čas nebo rozlišení. Proto byla potřeba vyvinout UHPLC metody bez ztráty účinnosti separace. UHPLC-MS/MS je v poslední době považována za hlavní trend v moderních bioanalytických metodách. Plynová chromatografie je v bioanalytických metodách využívána daleko méně, protože je třeba provést derivatizační krok před analýzou, aby byl získán těkavý derivát molekuly léčiva [1][12][13].

## 6.1 Příprava biologického materiálu

Vzorek biologického materiálu je nutné před vlastní analýzou upravit, a to s cílem izolovat a zakoncentrovat analyty z komplexní biologické matrice. Zároveň je důležité přechistit extrakty a odstranit co nejvíce balastních látek. Úprava vzorků patří mezi časově velmi náročné kroky při práci se vzorkem, a navíc má vliv na všechny následující kroky v další manipulaci se vzorkem. Biologické vzorky nejsou vhodné pro přímou separaci pomocí HPLC-MS/MS vzhledem k tomu, že obsahují velké množství složitých látek a interferujících sloučenin. Měla by být zvolena vhodná technika pro přípravu vzorku. V bioanalýze jsou nejčastěji zpracovávány kapalné vzorky jako plná krev, plazma, sérum, moč či sliny [13][14].

Základní dělení technik pro přípravu vzorků v bioanalýze zahrnuje dvě hlavní skupiny. Do první skupiny patří zavedené techniky jako deproteinace, extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) a extrakce na pevné fázi (SPE). Do druhé skupiny patří moderní techniky a přístupy v oblasti přípravy vzorku. Moderní trendy v přípravě vzorku by měly ulehčovat krok úpravy vzorku, hlavně by měly zkrátit dobu přípravy vzorku. Mezi další požadavky patří snížit spotřebu jak rozpouštědel používaných pro extrakci, tak samotného vzorku. Dále by mělo docházet ke snížení počtu kroků při přípravě vzorku a analýzy by měly mít možnost automatizace [14]. Mezi moderní trendy v přípravě vzorku jsou řazeny mikroextrakce nebo on-line techniky. Jejich hlavní výhodou je minimalizace nebo až nulová spotřeba rozpouštědla. Často je prováděna mikroextrakce do kapaliny (LLME). Tato mikroextrakce má také řadu nevýhod, jako je dlouhá doba potřebná pro ustálení rovnováhy při extrakci a také vyžaduje opatrnou



manipulaci či větší dovednosti obsluhy. Mezi mikroextrakce jsou řazeny též extrakce založené na pevné fázi jako je mikroextrakce plněným tuhým sorbentem (MEPS). MEPS je složena ze dvou částí, stříkačky a jehly obsahující SPE fázi. MEPS je využívána pro přípravu vzorků pro UHPLC separaci [14][13].

Proteinová precipitace patří k častým technikám přípravy vzorku, přestože tato technika je málo selektivní a přečistění vzorku je nedostatečné. Na druhé straně má tato technika mnoho výhod, jako je rychlé zpracování vzorku, snadný a rychlý způsob optimalizace či není třeba speciální zařízení na provedení úpravy vzorku [13].

## **6.2 Chromatografická separace v bioanalytických metodách**

Biologické vzorky jsou poměrně složité matrice, proto je pro jejich analýzu používáno HPLC-MS/MS spojení. MS/MS vyniká vysokou selektivitou. Jsou-li ve vzorku přítomny analyty lišící se dostatečně molekulovou hmotností, je používána metoda monitorování vybrané reakce (SRM), která umožňuje rychlou analýzu a vysokou propustnost vzorků. Přestože je MS/MS technika vysoce selektivní, stanovení sledovaných analytů může být komplikováno přítomností matricových efektů. Monitorování pomocí SRM snižuje vlivy interferencí, ale přítomnosti matricových efektů nezamezuje. Umožňuje separaci analytů od těchto interferencí, a také může zvýšit citlivost metody. SRM je využívána při analýze velmi nízkých koncentracích analytů ve složité matrici. Primární SRM přechod je používán pro kvantitativní účely a sekundární k potvrzení identity [13].

## **6.3 Citlivá a selektivní detekce v bioanalytických metodách**

Hlavním požadavkem pro detekci v bioanalytických metodách je vysoká citlivost, selektivita a široký lineární dynamický rozsah. Citlivou a selektivní detekci umožňuje MS díky specifickému způsobu sběru dat zahrnující monitorování vybraného iontu (SIM) nebo SRM, které jsou využívány v kvantitativní analýze v HPLC-MS [13].

Mezi nejběžnější techniky používané v bioanalýze patří ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosferického tlaku (APCI). ESI je používána při analýze polárních látek, zejména léčiv a jejich metabolitů [13].

Trojité kvadrupól (QqQ) je ideální přístroj pro sledování SRM přechodů, ale

mohou být použity také magnetické sektory nebo hybridní analyzátory založené na principu kvadrupólu. Výhoda QqQ hmotnostního analyzátoru spočívá ve schopnosti filtrování iontů o předem určené hmotnosti. Vzniklé ionty jsou následně fragmentovány specifickým způsobem. Výsledné fragmenty jsou poté monitorovány, což vede k vysoké analytické selektivitě. Trojité kvadrupóly jsou nejčastěji používáné hmotnostní analyzátory v kvantitativních bioanalytických metodách. Moderní QqQ jsou velmi rychlé přístroje, které umožňují získávání dostatečného počtu bodů přes chromatografické píky pro každý přechod alespoň 15, a to také u velmi úzkých píků při UHPLC separaci. Trojitý kvadrupól využívaný pro MS/MS kvantifikace má tu nevýhodu, že mohou být monitorovány jen očekávané sloučeniny a selektivně nastavené SRM přechody, tudíž se jedná o cílenou analýzu [13].

Na rozdíl od trojitého kvadrupólu založeného na SRM přechodech, pomocí celkového MS skenu je získán celkový iontový chromatogram s vysokou správností hmoty a s vysokým rozlišením. Umožňuje monitorování cílených i necílených látek s vysokou selektivitou. Je možné získat jak kvantitativní informaci, tak spolehlivě potvrdit strukturu. Takové spojení může být využito při detekci necílených látek bez nutnosti opakované analýzy vzorku. Z toho důvodu je spojení rychlé kapalinové chromatografie a HRMS (hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením) novou technikou, která je jednou z důležitých technik v oboru kvantitativní bioanalýzy. Pouze rychle skenující hmotnostní analyzátory jsou vhodné pro spojení UHPLC a HRMS. A proto, pouze Q-TOF a orbitrap splňují náročná kritéria vyžadovaná pro tento úkol. Relativně pomalá rychlost snímání orbitrap (1 spektrum/s) při maximální rozlišovací schopnosti vyžaduje dostatečně široké chromatografické píky při UHPLC separaci. Naopak, Q-TOF analyzátor umožňuje rychlé snímání a získávání dat, ale rozlišovací schopnost bývá nižší. Spojení UHPLC/HRMS přináší mnoho výhod, jako je kratší doba analýzy, vyšší citlivost a detailní informace o struktuře. Nicméně bylo zjištěno, že HRMS je dvakrát až pěkrát méně citlivý ve srovnání s trojitým kvadrupólem. Proto trojité kvadrupóly stále převažují při kvantitativní analýze v LC-MS/MS, díky jejich schopnosti monitorovat stovky SRM přechodů v jedné analýze. HRMS přístroje by mohly mít uplatnění v případě, že je požadována cílená i necílená analýza [13].

## 7. Validace analytických metod

Validace analytických metod je proces ověření, zda analytická metoda je spolehlivá a vhodná pro zamýšlený účel. Výsledný dokument validace se nazývá validační protokol. Jsou zjišťovány praktické hranice použitelnosti metody proto, aby při opakovaném použití tato metoda poskytovala správné a přesné výsledky. Validace je prováděna buď výrobcem analytické soupravy, nebo přímo laboratoří, pokud analytickou metodu sama vyvinula nebo modifikovala [15].

Bioanalytické či farmaceutické analýzy je nezbytné provádět v souladu s požadavky doporučených směrnic ICH (Mezinárodní konference pro harmonizaci technických požadavků pro registraci humánních léčivých přípravků) směrnice Q2, která je používána jak ve farmacii, tak v medicíně. Další směrnice EMA (Evropská léková agentura) a FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léků) slouží k validaci analytických metod, požadující náročné validační postupy a stanovení dalších parametrů kromě základních validačních parametrů (selektivita, citlivost, linearita, správnost a přesnost). Tyto parametry jsou již běžně zavedeny a určeny během validace metody, zpravidla na třech koncentračních hladinách v několika opakováních (obvykle 3 - 5). EMA je evropská směrnice, která schvaluje a registruje nová léčiva. Bioanalytická směrnice EMA vyžaduje provedení stanovení v několika opakováních a na více koncentračních hladinách. Dále jsou zavedeny nové validační parametry jako vliv matricových efektů nebo integrita ředění. Tab. 2 obsahuje shrnutí validačních parametrů podle tří zmíněných směrnic [16].

## 7.1 Validační parametry

**Tabulka 2.:** Validační parametry podle 3 směrnic dle [16].

validační parametry	ICH	FDA	FDA: limity	EMA	EMA: limity
selektivita	ano	6	Neinterferuje	6	Neinterferuje
přenosy analytu	ne	ne	ne	ano	<20% LLOQ
LOQ (limit kvantifikace)	LOQ	LLOQ, ULOQ	Správnost $\pm 20\%$ , Přesnost $\leq 20\%$	LLOQ, ULOQ	Správnost $\pm 20\%$ , Přesnost $\leq 20\%$
LOD (limit detekce)	LOD	ne	ne	ne	ne
linearita kalibrační křivky	5	6 až 8	Správnost $\pm 15\%$ , u LLOQ 20%	6*	Správnost $\pm 15\%$ , u LLOQ 20%
rozsah	ano	ne	ne	ano	Definováno jako LLOQ a ULOQ
správnost [%]	3x3	3x5	$\pm 15\%$ , u LLOQ $\pm 20\%$	4x5	$\pm 15\%$ , u LLOQ $\pm 20\%$
přesnost** [% RSD]	3x3	3x5	$\leq 15\%$ , u LLOQ $\leq 20\%$	4x5	$\leq 15\%$ , u LLOQ $\leq 20\%$
návratnost [%]	ne	3	-	ne	ne
integrita zředění	ne	ne	-	5	Správnost a přesnost $\pm 15\%$
matricové efekty [%]	ne	ne	ne	6	$\leq 15\%$ RSD
robustnost	ano	ne	ne	ne	ne
stabilita	ne	ano	***	ano	***
SST	ano	ne	ne	ne	ne

### Vysvětlivky:

**ano** - daný parametr je vyžadován ve směrnici, **ne** - daný parametr není vyžadován ve směrnici, \* stanovení je nutné provést v několika opakováních, \*\* přesnost se dále dělí na opakovatelnost, reprodukovatelnost a mezilehlou přesnost, \*\*\* je vyžadována dosti obsáhlá stabilitní studie

## 7.2 Stabilita statinů

Stabilita statinů je hodnocena za různých podmínek skladování jako jsou odlišné teploty a délky doby skladování. V testech stability jsou prováděny testy stability zásobních roztoků, pracovních roztoků analytů a vnitřního standardu. Mezi způsoby hodnocení stability je zařazeno uchovávání vzorku ve vodní lázni, několik cyklů zmrazování a následného rozmrazování a v ledově chladné vodní lázni. Dále je hodnocena dlouhodobá zkouška stability analytu v matrici uloženém v mrazícím boxu. Hodnocena je také stabilita skladování vzorku v autosampleru. Zkoušky stability mohou být prováděny při pokojové teplotě. Všechny zkoušky stability jsou prováděny pomocí vzorků pro kontrolu kvality (QC) na nízké a vysoké koncentrační úrovni. Tímto způsobem jsou prováděna stanovení absolutní stability statinů. Statin je považován za stabilní, pokud průměrně vypočtená koncentrace vzorků stability není odchýlena o  $\pm 15\%$  od průměrně vypočtené koncentrace analytů hodnocených ve vzorku kontroly kvality [10].

## 8. Analytické metody pro stanovení statinů

### 8.1 Atorvastatin

Tabulka 3. analytické metody pro stanovení atorvastatinu								
Analyzovaná látka	Materiál	Analytická metoda	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Čas [min]	Citlivost LOQ/LOD (ng/mL)	Zdroj / rok vydání
AT, <i>p</i> -OH AT, <i>o</i> -OH AT,	Lidská plazma	HPLC-MS/MS	Ascentis Express C18 (75 x 4,6 mm; 2,7 μm)	0,005% HCOOH, ACN, MeOH (35 : 25 : 40)	MS/MS ESI <sup>-</sup>	6	LLOQ = 0,050	[17] 2013
AT, <i>p</i> -OH AT, <i>o</i> -OH AT, ATL	Lidské sérum	UHPLC- MS/MS	Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μm)	ACN, octan amonný pH = 4 (30 : 70)	MS/MS (QqQ) ESI <sup>+</sup>	3,4	<b>AT:</b> LOQ = 0,08; LOD = 0,03 <b><i>p</i>-OH AT:</b> LOQ = 0,66; LOD = 0,33 <b><i>o</i>-OH AT:</b> LOQ = 0,49; LOD = 0,15 <b>ATL:</b> LOQ = 0,18; LOD = 0,15	[7] 2011
AT, MET, GLI	Lidská plazma	UHPLC- MS/MS	ALLtima HP C18 (50 x 4,6 mm; 3 μm)	ACN, 10 mM octan amonný pH = 3 (60 : 40) isokratická eluce	MS/MS ESI <sup>+</sup>	2,5	LOQ = 1,50	[18] 2012
AT		HPLC-MS/MS	Sunfire RP C18 (50 x 4,6 mm; 5 μm)	ACN, 0,05% CH <sub>3</sub> COOH (50 : 50)	MS/MS ESI <sup>+</sup>		LOQ = 2,5	[19] 2013
AT	Nečistoty z AT	HPLC/UV	C18 (250 x 4,6 mm; 3,5 μm)	ACN, THF (90 : 10) fosfátový pufr pH = 5,4	UV 220 nm	36,5	neuvedeno	[20] 2012
AT, <i>p</i> -OH AT, <i>o</i> -OH AT, AML	Lidská plazma	HPLC/MS-MS	Phenomex synergi polar-RP 80A (150 x 4,6 mm; 4 μm)	MeOH, voda (86 : 14) CCl <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H pH = 3,2	MS/MS ESI <sup>+</sup>	5	<b>AT:</b> LLOQ = 1,5 <b><i>o</i>-OH AT:</b> LLOQ = 1,0 <b><i>p</i>-OH AT:</b> LLOQ = 0,2 <b>AML:</b> LLOQ = 0,2	[21] 2013

**Tabulka 3.** analytické metody pro stanovení atorvastatinu - pokračování

Analyzovaná látka	Materiál	Analytická metoda	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Čas [min]	Citlivost LOQ/LOD (ng/mL)	Zdroj / rok vydání
AT	Lidská plazma	HPLC/UV	ODS-3C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm)	ACN, 0,1% CH <sub>3</sub> COOH (70 : 30)	UV 246 nm	4,52	LOQ = 1 LOD = 0,4	[22] 2009
AT	Tableta AT	UHPLC/UV	ZORBAX SB C18 (100 x 2,1 mm; 2,7 µm)	ACN, THF	UV 244 nm	17	neuveдено	[23] 2013
AT, p-OH AT, o-OH AT, ATL, SV, SVA,	Lidské sérum, lipoproteinové frakce	UHPLC-MS/MS	Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm)	ACN, 0,5 mM octan amonný pufr pH= 4 (30 : 70)	MS/MS ESI <sup>+</sup>	4,4	LOQ = 0,08-5,46 LOD = 0,01-1,80	[2] 2009
AT, p-OH AT, o-OH AT, SV, SVA, LV, LVA	Lidská plazma	HPLC-MS/MS	Agilent Zorbax Extend C18 (50 x 2,1 mm; 3,5 µm)	MeOH, 2 mM mravenčan amonný, 0,2% HCOOH (gradientová eluce)	MS/MS ESI <sup>+</sup>	12	<b>AT:</b> LLOQ = 0,1 <b>p-OH AT:</b> LLOQ = 0,1 <b>o-OH AT:</b> LLOQ = 0,1 <b>SV:</b> LLOQ = 0,1 <b>SVA:</b> LLOQ = 1 <b>LOV:</b> LLOQ = 0,1 <b>LOVA:</b> LLOQ = 1	[24] 2015

Pro stanovení **atorvastatinu** je často využívána metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která byla použita v šesti nalezených studiích. Z toho čtyřikrát ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Dále se do popředí dostává metoda UHPLC (čtyři nalezené studie), která přináší mnoho výhod, jako je možnost velmi rychlé a účinné separace složek ze směsi.

Mezi nejčastěji analyzované materiály patří lidská plazma či sérum. V jedné ze studií byla analyzována tableta obsahující atorvastatin.

Jako stacionární fáze pro stanovení atorvastatinu byl prakticky ve všech případech využíván modifikovaný silikagel s řetězcem C18. Ve dvou metodách byl také využíván hybridní sorbent založený na principu ethylenových můstků modifikovaný řetězec C18.

Mobilní fáze byla nejčastěji složena z acetonitrilu, methanolu, octanu nebo mravenčanu amonného. Směs také někdy obsahovala zředěnou kyselinu octovou či mravenčí rozpuštěnou ve vodě. V některých studiích směs mobilní fáze byla ještě obohacena o pufr. Jednalo se buď o pufr fosfátový (pH = 5,4), nebo octan amonný (pH = 3 – 4). Rozmezí pH pufrů splňuje podmínku zamezení interkonverze, pH se pohybuje v rozmezí 3 – 5, ale hodnota 3 už je hraniční pro interkonverzi.

V tabulce číslo 4 jsou uvedeny používané SRM přechody při analýze atorvastatinu a jeho metabolitů při využití MS/MS detekce. Hodnocení probíhalo ve většině případech v ESI<sup>+</sup>, pouze v jediném případě byl zaznamenán ESI<sup>-</sup>.

**Tabulka 4.:** SRM přechody při analýze atorvastatinu a jeho metabolitů.

Analyzovaná látka	Prekurzorový ion	SRM	Zdroj
Atorvastatin	[M-H] <sup>-</sup>	557,4 → 278,1	[21]
	[M+H] <sup>+</sup>	559,0 → 440,1	[2]
		559,2 → 440,2	[28]
Hydroxy atorvastatin	[M-H] <sup>-</sup>	573,5 → 278,1	[21]
	[M+H] <sup>+</sup>	575,0 → 440,1	[2]
		575,20 → 440,2	[28]
Atorvastatin lakton	[M+H] <sup>+</sup>	541,0 → 448,0	[2]



Čas chromatografické analýzy při analýze atorvastatinu a jeho derivátů se pohyboval kolem 2,5 - 36,5 minut v závislosti na tom, zda byl stanovován pouze atorvastatin a jeho metabolity nebo spolu s atorvastatinem i jiné statiny a další druhy léčiv. Dále byl čas ovlivněn také druhem chromatografické metody. UHPLC umožňuje rychlejší analýzu než HPLC. Nejrychlejší analýza byla uskutečněna pomocí spojení UHPLC-MS/MS trvajících 2,5 minuty [18].

Jako porovnávací validační parametr byla zvolena citlivost vyjádřená jako LOQ a LOD. Limit kvantifikace atorvastatinu při MS/MS detekci se pohyboval v rozmezí 0,08-5,46 ng/mL. V případě UV detekce nebyla skoro ve všech případech uvedena citlivost kromě publikace [22], kde bylo LOQ = 1 ng/mL.

Tabulka číslo 5 zahrnuje testy stability prováděné ve vzorku plazmy, který obsahoval atorvastatin, metformin a gliperidin. Mezi testy stability byly zařazeny uchovávání v autosampleru (při 5°C po dobu 51 hod), v chladničce (při 2 - 8 °C po dobu 27 hod), 12 hod ve vodní lázni, 6 cyklů zmražení a následného rozmražení, stabilita opakovaného nástřiku po dobu 44 hod a dlouhodobé uchování při -70°C. Při studiu testů stability docházelo k porovnání standardních hodnot LQC a HQC s hodnotami po vystavení různým podmínkám při testech stability. Hodnoty LQC a HQC jsou pro atorvastatin 1,50 a 125,13 ng/mL [18].

**Tabulka 5.:** Test stability atorvastatinu dle [18].

Test stability	QC (LOQ,HQC ng/mL)	Průměrná koncentrace (ng/mL)	Správnost/ stabilita (%)	Přesnost (%)
Stabilita v autosampleru (5°C, 51 hod)	1,50 125,13	1,33 134,75	88,72 107,69	5,63 4,36
Chladnička (2 - 8°C, 27 hod)	1,50 125,13	1,52 137,69	101,41 110,05	9,43 12,03
Vodní lázeň (12 hod)	1,50 125,13	1,38 128,02	91,61 102,32	1,41 6,71
Stabilita zmražení/rozmražení (6 cyklů)	1,50 125,13	1,49 139,65	99,19 111,61	7,55 2,18
Opakovaný nástřik (44 hod)	1,50 125,13	1,52 126,55	110,89 98,14	0,85 1,18
Dlouhodobá stabilita (-70°C, 68 dní)	1,50 125,13	1,50 127,71	112,29 101,79	3,30 4,96

## 8.2 Rosuvastatin

Tabulka 6.: analytické metody pro stanovení <b>rosuvastatinu</b>								
Analyzovaná látka	Materiál	Analytická metoda	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Čas [min]	Citlivost LOQ/LOD (ng/mL)	zdroj
RV, PV, LV, SV	Lidská plazma	HPLC/PDA	C8 (125 x 4 mm; 5 µm)	ACN, 0,1 M fosforečnan draselný pH = 2,5 (60 : 40)	PDA 237 nm	16	<b>RV:</b> LOQ = 349,17 <b>PRA:</b> LOQ = 971,61 - 1022,76 <b>LOV:</b> LOQ = 371,46 - 377,76 <b>SV:</b> LOQ = 376,78 - 379,45	[25] 2013
RV, EZE	Tableta (léková forma)	RP-HPLC/PDA	C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	ACN, voda, fosfátový pufr pH = 8 (40 : 10 : 50)	PDA 230 nm	7	<b>RV:</b> LOQ = 0,08; LOD = 0,05 <b>EZE:</b> LOQ = 0,6; LOD = 0,05	[26] 2013
RV, AT	Lidské sérum	RP-HPLC/UV	Brownlee C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm)	MeOH, voda (68 : 32) C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub> pufr pH = 3	UV 241 nm	<7	<b>RV:</b> LLOQ = 2; LLOD = 0,6 <b>AT:</b> LLOQ = 3; LLOD = 1	[27] 2011
RV, DS, TM	Lidská plazma, léčiva, nitrooční tek. (hovězí)	HPLC/UV	Hypersil BDS C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	0,2% TEA, ACN (40 : 60) 85 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pufr pH = 2,75 isokratická eluce	UV 284 nm	7	LOQ = 1,50 LOD = 0,500	[28] 2011
RV, AML	Lidská plazma	HPLC-MS/MS	ZORBAX SB C18 (50 x 4,6 mm; 3,5 µm)	0,1% HCOOH v 5 mM acetátu amonném, MeOH, ACN (20 : 20 : 60) isokratická eluce	MS/MS ESI <sup>+</sup>	<2,5	LOQ = 1,49 LLOQ = 0,52	[29] 2014
RV, MET, GLI, GLIQ	Lidské sérum	RP-HPLC/UV	Purospher Star C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	MeOH, voda (90 : 10) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH = 3	UV 231 nm	6	LOQ = 20 LOD = 61	[8] 2013

**Tabulka 6.:** analytické metody pro stanovení **rosuvastatinu** - pokračování

Analyzovaná látka	Materiál	Analytická metoda	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Čas [min]	Citlivost LOQ/LOD (ng/mL)	zdroj
RV	Kryší plazma	HPLC-UV/VIS	Waters Sun Fire C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	ACN, MeOH, 0,1 M HCOOH (60 : 10 : 30)	UV/VIS 240 nm	7,5	neuvedeno	[30] 2013
RV, AT, RVL	Povrchová voda	HPLC-MS/MS	Luna Phenyl-Hexyl (150 x 2 mm; 3 µm)	0,1 % HCOOH, MeOH (25 : 75)	MS/MS ESI <sup>+</sup>	15	neuvedeno	[31] 2009
RV, AT, FL, LV, PRA, SV	Odpadní voda, voda z řeky	HPLC/Q-TOF-MS	Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 x 4,6 mm; 1,8 µm)	ACN + 0,1 M HCOOH, 5 mM mravenčan amonný + 0,1 M HCOOH (30 : 70)	Q-TOF/MS ESI <sup>+</sup>	14	<b>RV:</b> LOD = 0,30 - 6,18 <b>AT:</b> LOD = 0,05 - 0,28 <b>FLU:</b> LOD = 3,73 - 17,0 <b>LOV:</b> LOD = 0,05 - 2,00 <b>PRA:</b> LOD = 10,5 - 11,3 <b>SV:</b> LOD = 0,04 - 0,70	[32] 2011
RV	Hrotnatka velká ( <i>Daphnia magna</i> )	Nano- UHPLC-MS/MS	BEH130 C18 (100 x 0,018 mm; 1,7 µm)	0,1 % HCOOH ve vodě, 0,1 % HCOOH v ACN (gradientová eluce)	MS/MS Q-TOF ESI <sup>+</sup>	28	neuvedeno	[33] 2014
RV	Tableta (léková forma)	HPLC/UV	Zorbax SB-Phenyl (150 x 4,6 mm; 5 µm)	ACN, THF, 20 mM citrátový pufr pH = 3	UV 254 nm	60	neuvedeno	[34] 2012
RV, FEN	Lidská plazma	HPLC-MS/MS	X-Terra MS C-18 (50 x 4,6 mm; 5 µm)	0,05 M fosfonoacetát, ACN (45 : 55)	MS/MS ESI <sup>+</sup>	5	LOQ = 0,1	[35] 2009
RV	Lidská plazma	UHPLC-MS/MS	BEH HILIC (50 x 2,1 mm; 1,7 µm)	<b>A:</b> 2,5 mM bikarbonát amonný ve vodě, ACN, NH <sub>4</sub> OH (98 : 2 : 1) <b>B:</b> 2,5 mM bikarbonát amonný ve vodě, ACN, NH <sub>4</sub> OH (2 : 98 : 0,01) gradientová eluce	MS/MS ESI <sup>-</sup>	2	LOQ = 0,1	[4] 2012

Pro stanovení **rosuvastatinu** byla nejvíce využita analytická metoda HPLC. Oproti atorvastatinu, při detekci rosuvastatinu převažovala UV-detekce a detekce pomocí PDA. Tyto typy detekce byly zaznamenány u sedmi nalezených studií. V některých publikacích bylo použito také spojení tandemové hmotnostní spektrometrie, které bylo použito v pěti nalezených studiích.

V tabulce číslo 7 je uveden SRM přechod při stanovení rosuvastatinu, který byl uveden pouze v jediné nalezené studii.

<b>Tabulka 7.:</b> SRM přechody při stanovení rosuvastatinu.			
<b>Analyzovaná látka</b>	<b>Prekurzorový ion</b>	<b>SRM</b>	<b>Zdroj</b>
Rosuvastatin	[M+H] <sup>+</sup>	482,18 → 258,14	[36]

Rosuvastatin byl nejčastěji stanovován v lidské plazmě či séru. Ve dvou studiích byla analyzována tableta obsahující rosuvastatin. Po jedné studii pak povrchová a odpadní voda.

Stejně jako u atorvastatinu, i u rosuvastatinu byl jako stacionární fáze ve většině případech použit silikagel modifikovaný dlouhými uhlíkovými řetězci (C8 nebo C18), kromě jedné studie, kde byl použit fenylhexyl a jedné, kde byl použit HILIC. Délka kolony se pohybovala kolem 50 - 250 mm, průměr pak 2 – 4,6 mm. V jedné ze studií byla použita k separaci nano-UHPLC-MS/MS, proto kolona měla průměr 0,018 mm [33]. Velikost částic byla v rozmezí 1,7 - 5 µm.

Nejvíce zastoupenou složkou mobilní fáze při stanovení rosuvastatinu byl acetonitril, který se objevoval ve spojení s fosforečnanem draselným, fosfonoacetátem nebo bikarbonátem amonným zředěným ve vodě. Většina mobilních fází byla obohacena navíc o fosfátový (pH = 8), citrátový pufr (pH = 3), kyselina fosforečná (pH = 2 - 3). Tyto pufrы mohly být použity, protože pro detekci většinou nebyla použita hmotnostní spektrometrie. Fosfátový pufr s pH = 8 není vhodný při analýze statinů, protože pH nad 6 není stabilní pro stanovení statinů, může nastat interkonverze. V mobilních fázích byly využity jak gradientová tak isokratická eluce.

Čas vybraných chromatografických metod pro stanovení rosuvastatinu se pohyboval mezi 2-28 minutami. Nejrychlejší analýza rosuvastatinu, která trvala 2 minuty, byla provedena pomocí UHPLC-MS/MS. Zde byla také použita nejmenší

velikost částice 1,7  $\mu\text{m}$  [4].

U vyhledaných analytických metod pro analýzu rosuvastatinu byl LOD v rozmezí 0,05–61 ng/mL. Nižší hodnoty limitu detekce dosahovaly 0,5 ng/mL, byly zaznamenány u spojení HPLC-MS/MS. Naopak, vysoké hodnoty LOD byly dosaženy u spojení LC/UV. V jedné ze studií hodnota LOD dosahovala 61 ng/mL, kde jako použitý materiál bylo použito lidské sérum a společně s rosuvastatinem byly analyzovány metformin, glimepirid a gliquidon [8].

Tabulka číslo 8 obsahuje informace zjištěné z testu stability rosuvastatinu. Zásobní roztok plazmy obsahoval spolu s rosuvastatinem i amlodipin a vnitřní standard. Zásobní roztoky byly uchovány různou dobu v autosampleru při 10°C, v chladničce v rozmezí teplot 2 - 8°C, při pokojové teplotě, v pěti cyklech byly zmrazeny a následně rozmrazeny, při opakovaném nástřiku a dlouhodobě uchovány při -70°C. Stabilita byla porovnávána právě vzhledem k hodnotám LQC a HQC, které u rosuvastatinu činily 1,49 a 46,03 ng/mL. Bylo zjištěno, že zásobní roztok rosuvastatinu spolu s amlodipinem a vnitřním standardem byl stabilní po uchování po 75 hodinách v chladničce v teplotním rozmezím 2-8°C [29].

<b>Tabulka 8.:</b> Test stability rosuvastatinu dle [29].				
<b>Test stability</b>	<b>LQC, HQC (ng/ml)</b>	<b>Průměrná koncentrace (ng/ml)</b>	<b>Správnost/stabilita (%)</b>	<b>Přesnost (%)</b>
Autosampler (10°C, 80 hod)	1,49 (LQC) 46,03 (HQC)	1,53 $\pm$ 0,02 45,77 $\pm$ 0,39	102,77 99,44	1,14 0,85
Chladnička (2 - 8°C, 75 hod)	1,49 (LQC) 46,03 (HQC)	1,52 $\pm$ 0,01 46,11 $\pm$ 0,34	102,56 100,19	0,95 0,73
Pokojová teplota (12 hod)	1,49 (LQC) 46,03 (HQC)	1,53 $\pm$ 0,02 46,08 $\pm$ 0,44	103,10 100,12	1,22 0,95
Stabilita zmražení/rozmražení (5 cyklů)	1,49 (LQC) 46,03 (HQC)	1,52 $\pm$ 0,02 45,71 $\pm$ 0,02	102,56 99,31	1,48 1,03
Opakovaný nástřik (42 hod)	1,49 (LQC) 46,03 (HQC)	1,48 $\pm$ 0,02 44,65 $\pm$ 0,39	99,93 97,01	1,56 0,87
Dlouhodobá stabilita (68 dní)	1,49 (LQC) 46,03 (HQC)	1,52 $\pm$ 0,02 46,12 $\pm$ 0,23	102,05 100,20	1,13 0,50

### 8.3 Pitavastatin

Tabulka 9.: analytické metody pro stanovení pitavastatinu								
Analyzovaná látka	Materiál	Analytická metoda	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Čas [min]	Citlivost LOQ/LOD (ng/mL)	zdroj
PT	Tableta PT	HPLC/PDA	LiChrospher RP-C18 (250 x 4 mm; 5 µm)	ACN, 10 mM fosfátový pufr, 85 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH = 4	PDA	31,1	neuvedeno	[9] 2008
PT, PTL	Lidská plazma, moč	HPLC-MS/MS	BDS Hypersil C8 (50 x 2,1 mm; 3 µm)	MeOH, 0,2% CH <sub>3</sub> COOH ve vodě (70 : 30)	MS/MS ESI <sup>+</sup>	4,5	LLOQ = 1	[10] 2008
PT, RV RVL	Lidská plazma, moč	HPLC-MS/MS	Shim-pack VP-C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm)	MeOH, voda, 0,05% HCOOH (75 : 25 : 0,05)	MS/MS ESI <sup>+</sup>	6	<b>Plazma:</b> LOQ = 0,16; LLOQ = 0,08 <b>Moč:</b> LOQ = 0,16; LOD = 0,08	[36] 2008
PT	Lidská plazma	HPLC-MS/MS	Luna C18 (50 x 2,0 mm; 5 µm)	ACN, MeOH, 1% HCOOH ve vodě (50 : 25 : 25)	MS/MS ESI <sup>+</sup>	2,1	LOQ = 0,5	[37] 2014
PT	Lidská plazma	HPLC- MS/MS	Agilent Zorbax SB-C18 (50 x 2,1 mm; 3,5 µm)	0,1 % HCOOH ve vodě, ACN+ 0,1 % HCOOH	MS/MS ESI <sup>+</sup>	5	LOQ = 0,1 - 150 LLOQ = 0,1	[38] 2014

Nejméně publikací o analytických metodách pro stanovení statinů bylo nalezeno pro **pitavastatin**. Pitavastatin patří k novějším druhům statinů a na trhu je k dispozici pouze v Japonsku.

Pro stanovení pitavastatinu bylo ve všech případech kromě jednoho použito spojení HPLC-MS/MS, které umožňovalo velmi rychlou a citlivou analýzu. V jedné studii byla použita metoda HPLC/PDA [9].

Tabulka číslo 10 zahrnuje informace o SRM přechodech pro stanovení pitavastatinu při MS/MS detekci.

Tabulka 10.: SRM přechody pro stanovení pitavastatinu.			
Analyzovaná látka	Prekurzorový ion	SRM	Zdroj
Pitavastatin	[M+H] <sup>+</sup>	422,4 → 290,3	[10]
	[M+H] <sup>+</sup>	422,0 → 290,1	[41]
	[M+H] <sup>+</sup>	421,9 → 290,1	[52]
Pitavastatin lakton	[M+H] <sup>+</sup>	404,3 → 290,3	[10]

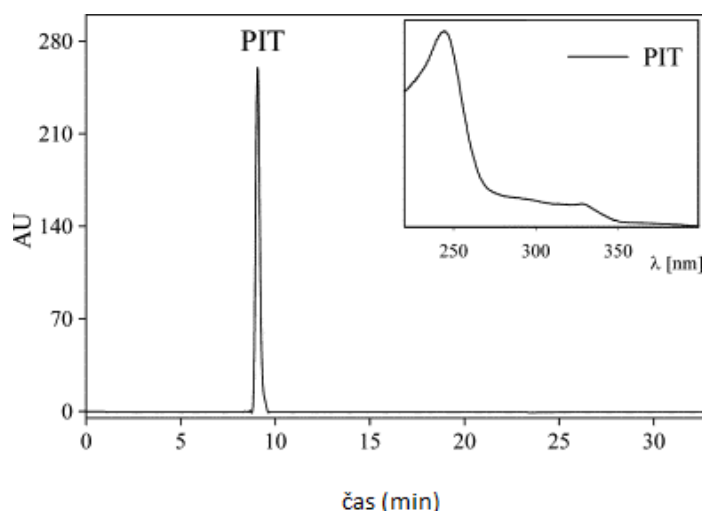
Pitavastatin byl nejčastěji stanovován z lidského materiálu, jako jsou plazma či moč.

Jako stacionární fáze pro stanovení pitavastatinu byl ve všech případech využíván modifikovaný silikagel s řetězcem C8 nebo C18. Délka kolony se pohybovala okolo 50 - 250 mm, průměr 2,0 - 4,6 mm. Velikost částic byla v rozmezí 3 - 5 µm, metoda UHPLC nebyla v tomto případě využita.

Mobilní fáze byla u pitavastatinu nejčastěji složena z acetonitrilu, methanolu a kyseliny mravenčí nebo octové zředěné ve vodě. Zastoupení jednotlivých složek bylo u každého stanovení v různém poměru. V jednotlivých publikacích byly využity jak gradientová tak isokratická eluce.

Čas chromatografické analýzy pitavastatinu se pohyboval v rozmezí 2,1 - 31,1 minut. Nejkratší chromatografické analýzy byly uskutečněny pomocí LC-MS/MS. Obrázek číslo 8 znázorňuje chromatogram a UV spektrum ve studii [9].

Validační parametr LOQ při MS/MS detekci se pohyboval v širokém rozmezí 0,1 – 150 ng/mL. Studie, kde byla použita PDA detekce, neobsahovala informace o citlivosti.



Obr. 6: Chromatogram a UV spektrum pitavastatinu [9].

Podle publikace [37] byla hodnocena stabilita pitavastatinu ve vzorku plazmy tak, že vzorky byly nejprve vystaveny v krátkém čase pokojové teplotě. Studie stability spočívala ve vystavení vzorku 2 hodinám při pokojové teplotě před přípravou a 8 hodinám při pokojové teplotě po přípravě. Poté byly vzorky ve dvou cyklech zmraženy (-20°C) a následně rozmraženy. Při poslední zkoušce stability byly vzorky 20 dní vystaveny teplotě -20 °C.

<b>Tabulka 11.:</b> Test stability pitavastatinu dle [37].				
<b>Test stability</b>	<b>LQC, MQC, HQC (ng/ml)</b>	<b>Průměrná koncentrace ng/ml</b>	<b>Přesnost (RSD,%)</b>	<b>Správnost</b>
Stabilita před přípravou (pokojová teplota, 2 hod)	0,5 (LQC) 20,0 (MQC) 320,0 (HQC)	0,47 ± 8,69 18,8 ± 7,25 303 ± 10,8	8,69 7,25 10,8	94 % 94 % 94,7 %
Stabilita po přípravě (pokojová teplota, 8 hod)	0,5 (LQC) 20,0 (MQC) 320,0 (HQC)	0,54 ± 3,47 19,4 ± 1,19 344 ± 4,8	3,47 1,19 4,8	108 % 97 % 107,5 %
Stabilita zmražení/ rozmražení (-20°C, 2 cykly)	0,5 (LQC) 20,0 (MQC) 320,0 (HQC)	0,52 ± 3,69 18,6 ± 4,99 343 ± 3,65	3,69 4,99 3,65	104 % 93 % 107,2 %
Dlouhodobá stabilita (-20°C, 20 dní)	0,5 (LQC) 20,0 (MQC) 320,0 (HQC)	0,49 ± 8,29 20,1 ± 1,79 301 ± 2,34	8,29 1,79 2,34	98 % 100,5 % 94,1 %



## 9. Závěr

Analýza statinů patří mezi velmi častá stanovení v bioanalytických a farmaceutických laboratořích. Je to dáno přibývajícím počtem pacientů, u kterých je indikována hypercholesterolemie. Právě tito pacienti bývají léčeni statiny.

Z informací nalezených ve vědeckých člancích bylo zjištěno, že stanovení statinů je nejčastěji prováděno z biologického materiálu, jako je plazma nebo moč. Statiny jsou dále stanovovány také v odpadních či povrchových vodách nebo v tabletách obsahujících statin. Pro stanovení statinů jsou nejčastěji používány chromatografické metody jako HPLC a UHPLC. Nejvhodnější spojení těchto metod je s MS/MS detekcí, která umožňuje zjistit více informací o analyzovaných látkách. Další velkou předností MS/MS detekce je její vysoká citlivost. Umožňuje stanovit i velmi nízké koncentrace analytů, což je důležité pro stanovení statinů v biologickém materiálu, jelikož jsou zde obsaženy ve stopovém množství. Ve většině nalezených stanovení statinů převažovala ionizace pomocí ESI+.

V nalezených studiích o analýze statinů převažovalo v separačním procesu jako složení mobilní fáze spojení acetonitrilu s methanolem obohacené o pufr či jednoduchou karboxylovou kyselinu zředěnou ve vodě. Jako pufr byly nejčastěji využívány citrátový pufr (pH = 3) nebo fosfátový pufr (pH = 5 – 8). Přestože použití pufru s pH nad 6 není vhodné z hlediska stability vzorku, v některých studiích byl tento pufr použit. Použití anorganického pufru v mobilní fázi bylo zaznamenáno nejvíce při UV detekci. Jako stacionární fáze byl prakticky vždy využit modifikovaný silikagel s prodlouženými uhlíkatými řetězci (C8 nebo C18). Z tohoto složení mobilních a stacionárních fází vyplývá, že se jednalo o chromatografii na reverzních fázích.

Nejrychlejší a zároveň nejcitlivější analýza statinů byla provedena pomocí spojení UHPLC-MS/MS, kde se citlivost pohybovala až v řádu setin ng/mL.

Jelikož statiny jsou v biologickém či jiném materiálu sledovány stále častěji, budou v budoucnosti stále více zdokonalovány techniky pro analýzu statinů a bude docházet k vývoji stále nových metod a podmínek pro šetrné, rychlé a citlivé stanovení.

## Seznam použité literatury

- [1] NOVÁKOVÁ L., ŠATÍNSKÝ D., SOLICH P., Trends. Anal. Chem., 27 (2008) 352.
- [2] NOVÁKOVÁ L., VLČKOVÁ H., ŠATÍNSKÝ D., SADÍLEK P., SOLICHOVÁ D., BLÁHA M., BLÁHA V., SOLICH P., J. Chromatogr. B 877 (2009) 2093-2103.
- [3] SVOBODA P., *Diplomová práce Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro stanovení statinů a jejich metabolitů* (2013).
- [4] PILAŘOVÁ V., *Diplomová práce Optimalizace kroku přípravy vzorku biologického materiálu pro UHPLC-MS/MS analýzu atorvastatinu, rosuvastatinu a jejich metabolitů* (2013).
- [5] LÜLLMAN H., MOHR K., HEIN L., *Barevný atlas farmakologie*. 5. vydání, Grada, 2007. ISBN-13: 978-80-247-1672-5.
- [6] HARTL J., DOLEŽAL M., KRINKOVÁ J., MILETÍN M., OPLETALOVÁ V., *Farmaceutická chemie III*. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2131-9.
- [7] VLČKOVÁ H., SOLICHOVÁ D., BLÁHA M., SOLICH P., NOVÁKOVÁ L., J. Pharm. Biomed. Anal. 55 (2011) 301-308.
- [8] ARAYNE M.S., SULTANA N., TABASSUM A., Clin. Chim. Acta, 425 (2013) 54-61.
- [9] GROBELNY P., VIOLA G., VEDALDI D., DALL'ACQUA F., GLISZYŃSKA-ŚWIGLO A., MIELCAREK J., J. Pharm. and Biomed. Anal., 50 (2009) 597-601.
- [10] TIAN L., HUANG Y., JIA Y., HUA L., LI Y., J. Chromatogr. B, 865 (2008) 127-132.
- [11] NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M. a kolektiv: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vydání, Praha: Europrint a.s., 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [12] NOVÁKOVÁ L., Vlčková H., Anal. Chim. Acta, 656 (2009) 8-35.
- [13] NOVÁKOVÁ L., J. Chromatogr. A, 1292 (2013) 25-35.
- [14] NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M. a kolektiv: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vydání, Praha: Europrint a.s., 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [15] PLZÁK Z., RIEDECKÝ B., KRATOCHVÍLA J.: *Metrologická terminologie v klinické a analytické laboratoři*. 2. vydání, Pardubice: SEKK, 2009.
- [16] NOVÁKOVÁ L., J. Chromatogr. A. 1292 (2013) 25-37.
- [17] PARTANI P., MANASWITA WERMAB S., GUREL S., KHUROO A., TAUSIF M., J. Pharm. Anal. 4 (2014) 26-36.

- [18] POLAGANI S.R., PILLI N.R., GAJULA R., GANDU V. J. Pharm. Anal. 3 (2013) 9-19.
- [19] ESTUDANTE M., MAYA M., MORAIS J.G., SOVERAL G., BENET L.Z., Mol. Pharmaceutics 10 (2013) 4038-4045.
- [20] GUPTA L.K., Mol. Bio. Spectro. 97 (2012) 495-501.
- [21] YACOUB M., AWWAD A.A., ALAWI M., ARAFAT T.: J. Chromatogr. B 917-918 (2013) 36-47
- [22] FARAHANI H., NOROUZI P., BEHESHTI A., SOBHI H.R., DINARVAND R., GANJALI M.R., Talanta 80 (2009) 1001-1006.
- [23] RAMESHA B., VENUGOPALA REDDY K.R., KISHORE B.V., AMITH KUMAR M.K., RAJU L.P., THARA N.B., J. Chromatogr. & Relat. Technol. 37 (2014) 275-297.
- [24] WANG J., LUZUM J.A., PHELPS M.A., KITZMILLER J.P., J. Chromatogr. B 983-984 (2015) 18-25.
- [25] FAGUNDES W.F., LEITE C.P., PIANETTI G.A., FERNANDES CH., J. Chromatogr. B 947-948 (2014) 8-16.
- [26] BELUDARI M.I., PRAKASH K.V., MOHAN G.K., Inter. J. Chem. Anal. Sci. 4 (2013) 205-209.
- [27] SHAH Y., IGBAL Z., AHMAD L., KHAN A., KHAN M.I., NAZIR S., NASIR F.: J. Chromatogr. B 879 (2011) 557-563.
- [28] NASIR F., IGBAL Z., KHAN A., AHMAD L., SHAH Y., KHAN A.Z., KHAN A.J., KHAN S., J. Chromatogr. B 879 (2011) 3434-3443.
- [29] NARAPUSETTI A., BETHANABHATLA S.S., SOCKALINGAM A., REPAKA N., SARITHA V., J. Advan. Re. (2014) 1-10.
- [30] BALAKUMAR K., RAGHAVAN CH.V., SELVAN N.T., PRASAD R.H., ABDU S., Coll. Surf. B: Biointer. 112 (2013) 337-343.
- [31] LEE H.-B., PEART T.E., SVOBODA M.L., BACKUS S., Chemosphere 77 (2009) 1285-1291.
- [32] MARTÍN J., BUCHBERGER W., ALONSO E., HIMMELSBACH M., APARICIO I., Talanta 85 (2011) 607-608.
- [33] MACHADO T.C., PIZZOLATO T.M., ARENZON A., SEGALIN J., LANSARIN M.A., Sci. Tot. Envir. 502 (2015) 571-577.
- [34] LITVIĆ M., ŠMIC K., VINKOVIĆ V., FILIPAN-LITVIĆ M.: J. Photochem. Photobio. A, Chemistry 252 (2013) 84-92.

- [35] TRIVEDI R.K., KLEEM R.R., MULLANGI R., SRINIVAS N.R., J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2009) 661.
- [36] DI B., SU M.-X., YU F., QU L.-J., ZHAO L.-P., CHENG M.-CH., HE L.-P., J. Chromatogr. B 866 (2008) 95-101.
- [37] YIN T., LIU Q., HUI Z., ZHAO L., LIU H., LI M., CUI M., REN W., A. J. Pharm. Sci. 9 (2014) 348- 355.
- [38] HUANG Y., LI Z., PAN G., LIU Y., SUN J., GU X., LI N., WANG B., Clin. Therap. 36 (2014) 1205-1216.