

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**MOŽNOSTI STANOVENÍ HLADIN STATINŮ
V BIOLOGICKÝCH TEKUTINÁCH METODAMI HPLC A GC**

Diplomová práce

Hradec Králové 2007

Olga Kotlíková

Děkuji RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za zadání tématu, cenné rady a pomoc při vypracování této diplomové práce.

Také bych ráda poděkovala všem, kteří mi byli během mé práce jakkoliv nápomocni.

Obsah

OBSAH	4
-------------	---

1 CÍL PRÁCE	8
2 REŠERŠE	10
2.1 Úvod	10
2.2 Mechanismy farmakologických účinků statinů	11
Přímý účinek na HMG-CoA reductázu	11
Mechanismy vedlejších účinků	12
Antiatherosklerotické účinky	13
Farmakologický účinek statinů a genetický polymorfismus	13
2.3 Farmakokinetika statinů	13
2.3.1 Metabolismus statinů	14
Cytochrom P450	14
UDP-glukuronyltransferáza	15
Biliární sekrece	15
Urinární sekrece	15
2.3.2 Intestinální absorpce	16
2.3.3 Enterohepatální cirkulace	16
2.3.4 Distribuce	17
Distribuce do centrálního nervového systému	17
Distribuce do kosterního svalstva	17
2.3.5 Eliminační mechanismy a potenciální lékové interakce	17
2.4 Bezpečnostní aspekty	19
2.5 Analytické metody stanovení statinů	20
2.5.1 Podmínky validace analytické metody současného stanovení analytů podléhajících interkonverzi ex vivo	27
2.5.2 Stabilita statinů (laktonů a hydroxykyselin) v roztocích	32
2.5.3 Konverze statinů z forem laktonu na odpovídající formy hydroxykyselin v alkalických podmínkách	32
2.5.4 Chromatografické a spektrometrické podmínky LC/MS/MS metod stanovení laktonů a hydroxykyselin v biologických vzorcích	33
2.6 Jednotlivé metody stanovení statinů	37
2.6.1 Atorvastatin	37
2.6.1.1 Klinická farmakokinetika	37
2.6.1.2 Přehled analytických metod	38
2.6.1.3 Metoda kapalinové chromatografie/ tandemové hmotnostní spektrometrie ke stanovení atorvastatinu a jeho aktivních metabolitů ortho-hydroxy (o-AT) a para- hydroxy (p-AT) atorvastatinu v lidské, psí a myši plasmě (William W. Bullen et al.)	39
2.6.1.4 Stanovení kyselé formy atorvastatinu, jeho laktonu a biotransformačních produktů v lidském séru vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií/tandemovou hmotnostní spektrometrií (M. Jemal et al.)	44
2.6.1.5 Současné stanovení atorvastatinu a jeho aktivních metabolitů v lidské plasmě kapalinovou chromatografií-tandemovou hmotnostní spektrometrií s použitím rosuvastatinu jako vnitřního standardu (Ramakrishna V.S. Nirogi et al.)	47
2.6.1.6 Stanovení atorvastatinu a jeho metabolitů v lidské plasmě po extrakce na pevnou fázi metodou LC/MS/MS (M. Hermann, H. Christensen, J.L.E. Reubsæet)	51

2.6.1.7	Stanovení atorvastatinu v lidském séru kapalinovou chromatografií na obrácených fázích s UV detekcí (<i>Gholamreza Bahrami et al.</i>).....	55
2.6.2	<i>Simvastatin</i>	58
2.6.2.1	Klinická farmakokinetika	58
2.6.2.2	Přehled analytických metod.....	58
2.6.2.3	Validovaná HPLC-MS/MS metoda současného stanovení simvastatinu a simvastatin hydroxykyseliny v lidské plasmě (<i>B. Barrett et al.</i>)	60
2.6.2.4	Současné stanovení simvastatinu a příslušné β -hydroxykyseliny v lidské plasmě kapalinovou chromatografií/tandemovou hmotnostní spektrometrií po LLC extrakci (<i>Jamie J. Zhao, Iris H. Xie, Amy</i>)	63
2.6.2.5	Stanovení simvastatinu v lidské plasmě kapalinovou chromatografií-hmotnostní spektrometrií (<i>Haitao Yang, Yan Feng, Yiwen Luan</i>)	68
2.6.2.6	Současné stanovení simvastatinu a odvozené kyseliny LC-MS-MS metodou po přímém nástřiku vzorku plasmy (<i>M. Jemal, Z. Ouyang, M. L. Powell</i>)	72
2.6.2.7	Stanovení simvastatinu a jeho aktivního metabolitu v lidské plasmě metodou HPLC technikou přepínání kolon s fluorimetrickou detekcí po derivatizaci 1-bromacetylpyrenem (<i>H. Ochiai, N. Uchiyama, K. Iwasaki, S.Hata, T. Kamei</i>).....	78
2.6.3	<i>Fluvastatin</i>	82
2.6.3.1	Klinická farmakokinetika	82
2.6.3.2	Přehled analytických metod.....	83
2.6.3.3	Kvantitativní stanovení fluvastatinu v lidské plasmě metodou GC/NICI-MS s použitím vnitřního standardu [$^{18}\text{O}_2$]-fluvastatinu (<i>H. J. Leis, W. Windischhofer</i>).....	84
2.6.3.4	Stereoselektivní analýza fluvastatinu v lidské plasmě pro účely farmakokinetické studie (<i>V. L. Lanchote, A. Rocha, F. U. V. de Albuquerque, E. B. Coelho, P. S. Bonato</i>).....	87
2.6.3.5	Stanovení fluvastatinu a jeho pěti metabolitů v lidské plasmě s použitím gradientové RP-HPLC metody s UV detekcí (<i>A. Nakashima, Ch. Saxer, M. Niina, N. Masuda, K. Iwasaki, K. Furukawa</i>)	90
2.6.3.6	Stanovení enantiomerů a racemátu fluvastatinu v lidské plasmě kapalinovou chromatografií s fluorimetrickou detekcí (<i>H. Toreson, B.-M. Eriksson</i>).....	94
2.6.3.7	Stanovení fluvastatinu v lidské plasmě metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (<i>G. Kalafsky, Harold T. Smith</i>).....	99
2.6.3.8	Stanovení fluvastatinu metodou HPLC s fluorimetrickou detekcí (<i>S. Al-Rawithi, F. H. Rajaa, A. Alzahrani</i>)	103
2.6.4	<i>Lovastatin</i>	104
2.6.4.1	Měření hladin lovastatinu v plasmě při automatickém odebírání vzorků (<i>Shau-Chun Wang et al.</i>)	105
2.6.4.2	Stanovení lovastatinu a příslušné hydroxykyseliny v plasmě potkanů a myší metodou kapalinové chromatografie/tandemové hmotnostní spektrometrie (<i>Y. Wu, J. Zhao, J. Henion, W.A. Korfmacher, Amelia P. Lapiguera, Chin-Chung Lin</i>).....	107
3 ZÁVĚR	111
	<i>Seznam použité literatury</i>	112

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APO	apolipoprotein
AT	atorvastatin
ATC skupina	anatomicko-terapeuticko-chemická skupina
CoASH	redukována forma koenzymu A
CYP450	cytochromoxidázový mikrosomální systém
CYP7A1	enzym cholesterol 7 α -hydroxyláza
ESI	elektrosprayová ionizace
FV	fluvastatin
GC	plynová chromatografie
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
IC ₅₀	minimální inhibiční koncentrace
IDL	lipoproteiny o střední hustotě
IS	vnitřní standard
LC	kapalinová chromatografie
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LLCE	liquid-liquid cartridge extraction
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovení
LSE	liquid-solid extraction
LV	lovastatin
LVA	lovastatin hydroxykyselina
MRM	multiple reaction monitoring
Mrp	multidrug resistance associated protein
MS	hmotnostní spektrometrie
MTBE	methyl-terc-butylether
NICI	chem. ionizace za vzniku negativních iontů
o-AT	ortho-hydroxyatorvastatin
OAT3	přenašeč organických aniontů 3
OATP	polypeptid transportující organické anionty
p-AT	para-hydroxyatorvastatin
PFBBr	pentafluorobenzylbromid
P-gp	P-glykoprotein
PV	pravastatin
QC	kontrolní vzorek
SIM	single ion monitoring
SPE	extrakce na pevnou fázi
SRM	selected reaction monitoring
SV	simvastatin
SVA	simvastatin hydroxykyselina
TBAF	fluorid tetrabutylamonný
TBAHSO ₄	hydrogensíran tetrabutylamonný
W.I.S.	pracovní roztok vnitřního standardu

1 Cíl práce

1 Cíl práce

Cílem této práce bylo podat kompletní přehled analytických možností stanovení jednotlivých statinů v biologickém materiálu a podrobně popsat jednotlivé metody stanovení. Zvláště některé postupy bylo nutné vyložit velmi podrobně *vzhledem* k problematickým a vzájemně navazujícím krokům v analýze. Součástí rešerše bylo také začlenění důležitých ilustračních obrázků dokumentujících postup či výsledky stanovení (analytické systémy, chromatogramy, ionizační postupy MS, fragmentace molekul v MS atd.).

Zpracovány byly publikace týkající se léčiv ze skupiny inhibitorů HMG-CoA reductázy registrovaných v ČR s ohledem na frekvenci jejich používání v klinické praxi. Jmenovitě se jedná o atorvastatin a simvastatin, v menší míře jsou používány fluvastatin a lovastatin.

V rámci komplexního pojetí byly zahrnuty informace o farmakologických vlastnostech a zejména farmakokinetických parametrech statinů, jejichž znalost má zásadní význam pro odběr vzorků i volbu analytických podmínek. Byly zohledněny také specifické aspekty provázející stanovení těchto léčiv, zejména chemická nestabilita v biologickém materiálu a v analytickém systému.

Celkovým cílem práce tedy bylo poskytnout co nejširší informace o problematice statinů, zejména v analytické části, tak, aby bylo možné popsané postupy úspěšně reprodukovat.

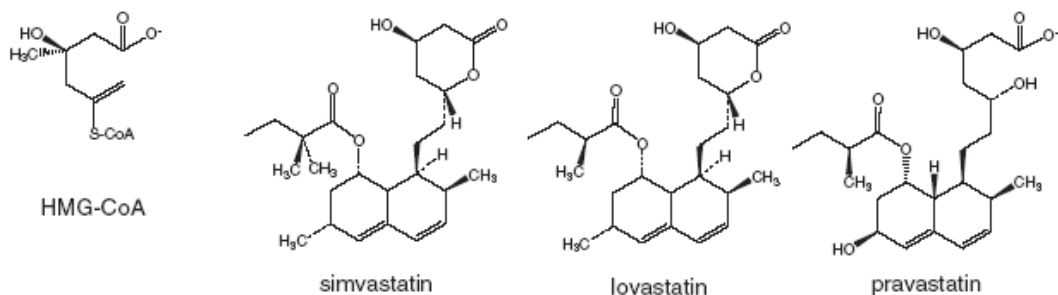
2 Rešerše

2.1 Úvod

Inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reduktázy (statiny) inhibují syntézu mevalonátu, která je klíčovým krokem v biosyntéze cholesterolu, a následně snižují plasmatické hladiny lipoproteinů o nízké hustotě transportující cholesterol (LDL-cholesterol). Vysoké hladiny LDL-cholesterolu jsou rizikovým faktorem aterosklerosy (1). Nejzávažnějším důsledkem aterosklerosy je zvýšení incidence srdečně cévních onemocnění a mortality s nimi spojené. Podle statistik je 38 až 42% všech úmrtí v západních a jiných vyspělých zemích spojených se srdečně cévním onemocněním. Snížení hladiny cholesterolu může zastavit či zvrátit proces aterosklerosy v cévních ložiscích a významně snížit morbiditu a mortalitu. Každé snížení hladiny cholesterolu o 10% je spojeno s 20–30% snížením incidence srdečně cévních chorob. Hlavními zásadami léčby hyperlipidémie je změna životního stylu a stravování, se současným podáváním antihyperlipidemik. Hlavní skupiny těchto léčiv představují pryskyřice vázající žlučové kyseliny, fibráty, inhibitory HMG-CoA reduktázy (statiny), kyselina nikotinová, probukol a omega-3-nenasycené mastné kyseliny. Nejúčinnějšími léčivy jsou statiny. Prokazatelně snižují riziko koronárních příhod a mají méně vedlejších účinků než ostatní léčiva příslušné ATC skupiny (2). Některé statiny se však vyznačují závažnými nežádoucími účinky jako myopathie a rhabdomyolýza. Konkomitantní terapie jinými léčivy toto riziko zvyšuje. Na následky myotoxicity zemřelo v USA 31 pacientů užívajících cerivastatin, z nichž polovina byla současně léčena gemfibrozilem. Při kombinované terapii statiny a fibráty se zvyšuje plasmatická hladina cerivastatinu v důsledku lékové interakce. Pro tyto závažné nežádoucí účinky byl cerivastatin v roce 2001 stažen z trhu (1).

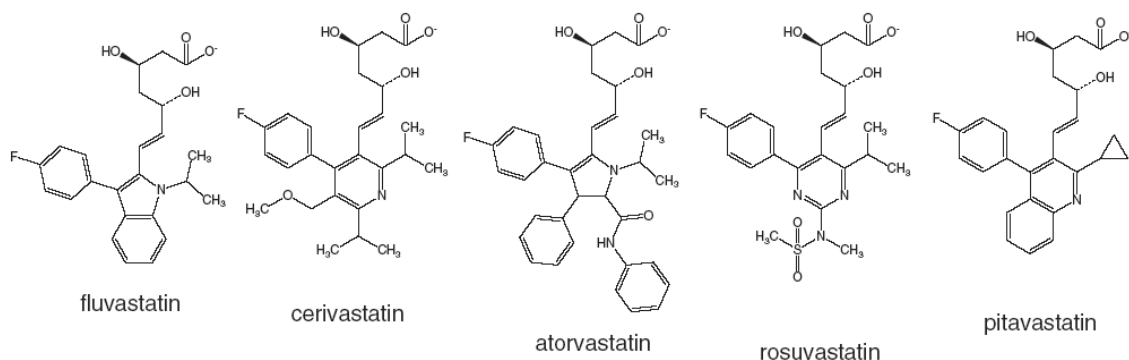
První objevenou sloučeninou z této skupiny léčiv byl mevastatin, sekundární produkt mikroskopické houby *Penicillium citrinum*, který se terapeuticky nevyužívá (1). Lovastatin je přírodní látka produkovaná jako sekundární metabolit houby *Aspergillus terreus* (2). Endo a Monacolin poprvé izolovali lovastatin (také zvaný mevinolin) z druhu *Monascus ruber*. Alberts et al. izolovali lovastatin z druhu *Aspergillus terreus*. Od té doby bylo izolováno a syntetizováno mnoho druhů statinů. Endo et al. a Alberts také naznačili, že mnoho druhů rodu *Monascus* stejně jako jiné vláknité houby např. *Doratomyces*, *Eupenicillium*, *Gymnoascus*, *Hypomyces*, *Penicillium*, *Phoma* a *Trichoderma* mohou produkovat lovastatin (3).

Simvastatin a pravastatin jsou vyráběny polosynteticky z lovastatinu a mevastatinu (2). Lovastatin a simvastatin obsahují ve své struktuře laktonový kruh, který je v organismu štěpen na aktivní kyselou formu. Pravastatin je podáván v biologicky aktivní formě s otevřeným laktonovým kruhem. Na druhé straně, fluvastatin je zcela syntetického původu a má odlišnou strukturu od přírodních derivátů. Fluvastatin je derivát mevalonolaktonu s indolovým jádrem substituovaným fluorofenylem. Ostatní syntetizované statiny mají podobnou strukturu obsahující fluorofenylovou skupinu. Všechny syntetické statiny jsou podávány ve formě kyselých aktivních sloučenin. V závislosti na jejich chemické struktuře mají různou afinitu k HMG-CoA reduktáze, která určuje jejich farmakologické účinky a různé farmakokinetické vlastnosti (distribuci do tkání, metabolickou stabilitu, enzymy a přenašeče účastníci se metabolismu). Znalost jejich fyzikálně-chemických vlastností má tedy význam pro pochopení farmakokinetických vlastností. Typ lékové interakce se odvíjí od farmakokinetických vlastností každého ze statinů. Ve farmakokinetice statinů mohou existovat interindividuální rozdíly spojené s genetickým polymorfismem metabolických enzymů a transporterů (1).



Obr.1. *Přírodní statiny.*

Simvastatin, lovastatin a pravastatin jsou strukturálně příbuzné deriváty přírodních produktů s hydronaftalenovým jádrem. Simvastatin a lovastatin jsou podávány v inaktivní formě proléčiva, zatímco pravastatin je podáván ve formě aktivní kyselé sloučeniny (1).



Obr. 2. *Syntetické statiny.*

Statiny syntetického původu mají odlišnou strukturu, ale součástí jejich molekuly je rovněž část podobná HMG-CoA, která se nachází mezi skupinami 4-fluorfenylovou a isopropylou (cyklopropylovou). Rozdílné struktury způsobují rozdílnou rozpustnost ve vodě (1).

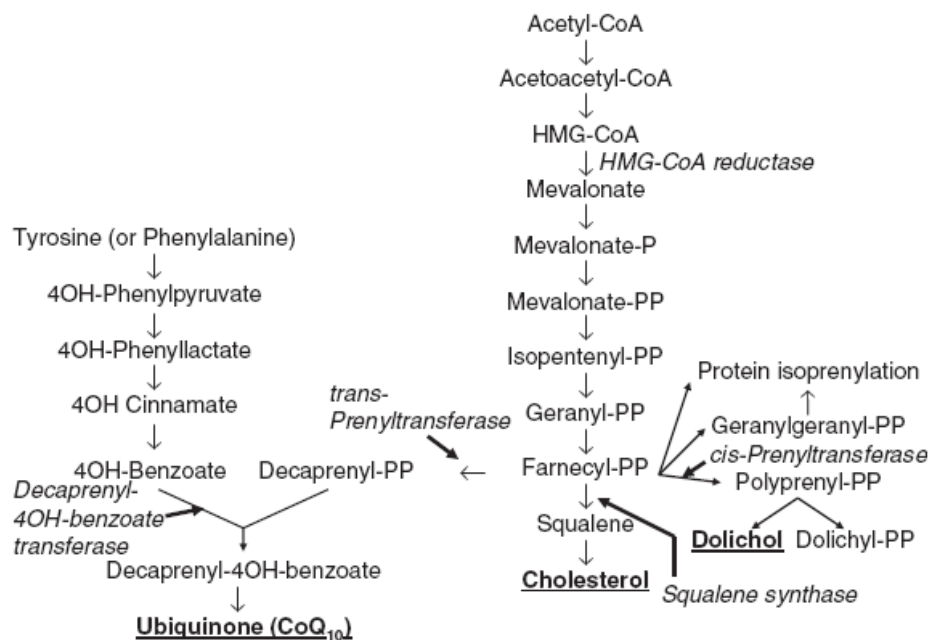
2.2 Mechanismy farmakologických účinků statinů

Přímý účinek na HMG-CoA reduktázu.

Statiny specificky a kompetitivně inhibují HMG-CoA reduktázu, neboť obsahují ve své molekule část podobnou HMG (3-hydroxy-3-methylglutarátu). Mají přibližně třikrát větší afinitu k enzymu HMG-CoA reduktáze než přirozená látka HMG-CoA; simvastatin a lovastatin mají místo této části laktonový kruh a jsou v organismu transformovány na biologicky aktivní formy s otevřeným kruhem. Novější statiny mají HMG-část a vykazují vyšší inhibiční potenciál. Tato léčiva velmi účinně snižují hladiny celkového cholesterolu a LDL (lipoproteinů o nízké hustotě) u několika druhů hypercholesterolemie (2).

Na obr. 3 je schematicky znázorněna biosyntéza cholesterolu. Pokud je HMG-CoA reduktáza inhibována, klesne produkce mevalonátu. V důsledku snížení produkce mevalonátu klesnou hladiny plasmatického cholesterolu. Následně se zvýší počet LDL- receptorů v membránách buněk (up-regulace) zvýšením transkripce jejich genů, aby byl zajištěn dostatek intracelulárního cholesterolu. CYP7A1 (cholesterol 7 α -hydroxyláza) v játrech

transformuje intracelulární cholesterol na žlučové kyseliny. Biodegradace cholesterolu v játrech vede k celkovému snížení hladin cholesterolu v organismu. Kromě zvýšeného vychytávání a degradace LDL-cholesterolu je snížena jeho oxidace. Dalším mechanismem je snížení produkce lipoproteinů játry. Cílovým orgánem statinů jsou tedy játra (1).



Obr. 3. Biosyntéza cholesterolu.

Cholesterol je syntetizován z acetyl-CoA. Syntéza mevalonátu katalyzovaná HMG-CoA reduktázou je klíčovým krokem biosyntézy. Farnesyl-pyrofosfát je rovněž výchozí sloučeninou pro biosyntézu izoprenoidů dolicholu a ubichinonu (1).

Mechanismy vedlejších účinků.

Podrobný mechanismus nežádoucích účinků není stále znám, ale podle některých hypotéz samotná inhibice HMG-CoA reduktázy může přímo způsobit mytoxicitu. Cholesterol je syntetizován kromě jater také v extrahepatálních tkáních. Expozice tkání statiny potlačuje normální funkci buněk a biosyntézu steroidních hormonů. Snížení syntézy cholesterolu ve svalových buňkách působením statinů způsobí pokles jeho obsahu v plasmatické membráně s následným poškozením buněk. Proti této hypotéze však stojí fakt, že inhibice skvalen -syntázy nevyvolává mytoxicitu (viz obr. 3).

Inhibice HMG-CoA reduktázy také snižuje syntézu farnesyl-pyrofosfátu, intermediárního produktu při tvorbě ubichinonu/koenzymu Q₁₀ (CoQ₁₀). CoQ₁₀ je steroidní isoprenoid hrající významnou roli v přenosu intracelulární energie v mitochondriálním transportním systému a chránící buněčnou integritu stabilizací membrán. Jeho nízká hladina může být jedním z faktorů zvyšujících mytoxicitu. Některé studie potvrzují, ale jiné vyvracejí vztah mezi statiny navozenou mytoxicitou a CoQ₁₀; nicméně hypotézu, že statiny indukovaná mytoxicitu je spojená se snížením hladin CoQ₁₀, nelze vyvrátit, neboť nejsou dostupná data o hladinách CoQ₁₀ v kosterním svalstvu pacientů pravidelně užívajících statiny.

Bylo také prokázáno, že snížení produkce farnesyl-pyrofosfátu a geranylgeranyl-pyrofosfátu, které aktivují určité regulační proteiny (Ras, Rac a Rho), je spojeno s apoptózou svalových buněk (1).

Antiatherosklerotické účinky.

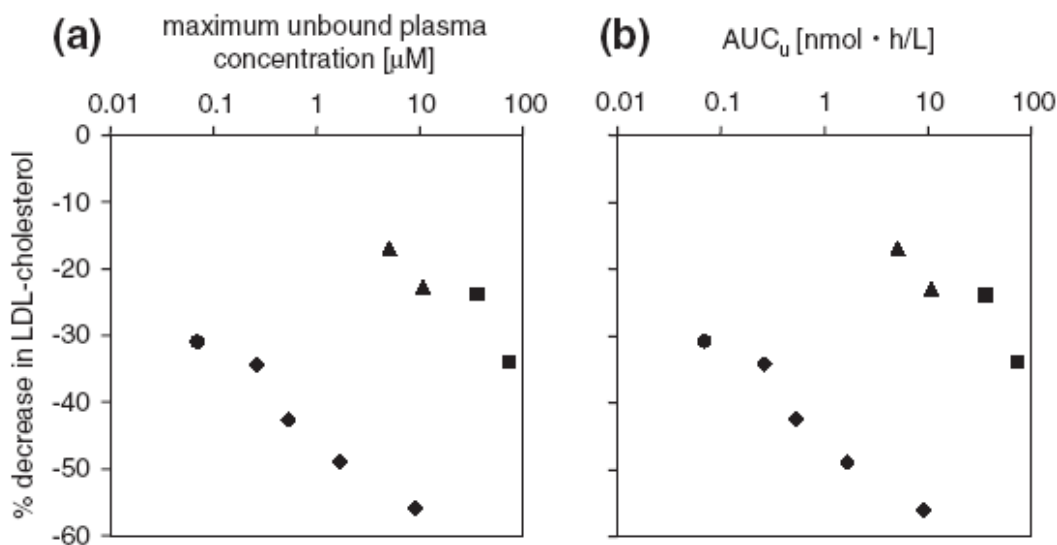
Kromě přímé inhibice syntézy cholesterolu spojené s HMG-CoA reduktázou snižují statiny riziko kardiovaskulárních onemocnění i jinými mechanismy. Mevalonová kyselina je prekurzorem nejen pro cholesterol, ale i pro isopentyl-adenosin (obsažen v t-RNA) a dolichol (syntéza glykoproteinů a CoQ₁₀). Kromě toho metabolity mevalonové kyseliny farnesyl-pyrofosfát a geranylgeranyl-pyrofosfát zprostředkovávají prenylaci proteinů zahrnutých v procesech buněčné signalizace, diferenciaci, proliferaci a myelinizaci. Inhibicí prenylace některých proteinů statiny brání vzniku atherosklerotických změn ovlivněním arteriálních myocytů, makrofágů a metaloproteáz (1).

Farmakologický účinek statinů a genetický polymorfismus.

Bylo provedeno mnoho farmakogenetických studií zkoumajících interindividuální rozdíly v plasmatických hladinách cholesterolu a v odpovědích na terapii statiny. V souvislosti s reakcí na terapii statiny bylo zkoumáno více než 30 genů. Některé měly přímou souvislost s biosyntézou cholesterolu nebo hypercholesterolémií, jiné ovlivňovaly farmakokinetiku statinů. Polymorfismus genů pro LDL receptory, HMG-CoA reduktázu, CYP7A1, apolipoprotein A1 (APOA1), APOB, APOE může ovlivnit farmakologický účinek statinů a zapříčinit rozdíly v jejich farmakologických či toxických účincích (1).

2.3 Farmakokinetika statinů

Statiny se liší svými farmakokinetickými vlastnostmi v závislosti na fyzikálně chemických vlastnostech. Simvastatin a lovastatin, které jsou podávány ve formě proléčiv s uzavřeným laktonovým kruhem, jsou více lipofilní než ostatní statiny (1). Relativně lipofilní je rovněž atorvastatin (2). Obecně, lipofilní statiny mohou snadno pronikat lipidovou dvojrůstvou membrán pasivní difúzí a jejich distribuce do tkání je nespecifická. Jejich IC₅₀ hodnota je (testováno na membránových systémech obsahujících substrát) v porovnání s hydrofilními statiny nízká, přestože obě skupiny mají srovnatelnou inhibiční aktivitu. Hydrofilní statiny (pravastatin, rosuvastatin) obtížně prostupují membránami buněk (s výjimkou hepatocytů), ale inhibují HMG-CoA reduktázu stejně účinně, neboť jsou v hepatocytech vychytávány aktivním transportním systémem. Specifický transportní systém jaterního vychytávání byl popsán pro mnoho léčiv včetně statinů. Především u statinů může léková interakce na úrovni transportního systému ovlivnit jejich farmakologický účinek, neboť játra jsou jejich cílovým orgánem působení. Bylo zjištěno, že membránovými přenašeči statinů v hepatocytech jsou polypeptidy transportující organické anionty (OATPs) a přenašeč organických aniontů 3 (OAT3). Vychytávání zprostředkované specifickými přenašeči přispívá k selektivní distribuci do jater. IC₅₀ hodnoty pravastatinu stanovené pro extrahepatální tkáň jsou mnohem vyšší než u simvastatinu, zatímco hodnoty naměřené v jaterních buňkách jsou srovnatelné. Tato skutečnost je přičítána právě specifickému vychytávání v játrech. Podobné charakteristiky jako pravastatin mají atorvastatin a rosuvastatin. Vychytávání statinů v hepatocytech může souviset s jejich farmakologickým účinkem in vivo. Na obr. 4 je graficky popsána závislost snížení hladin cholesterolu na volných plasmatických hladinách statinů. Z obrázku vyplývá, že atorvastatin a cerivastatin mají vyšší účinek při nižších plasmatických koncentracích než pravastatin a fluvastatin. Tento fakt nelze kvantitativně vysvětlit rozdílnou afinitou k HMG-CoA reduktáze, a je částečně způsoben zvýšenou mírou jaterního vychytávání (1).



Obr. 4. Vztah mezi účinkem na snížení hladiny cholesterolu a maximálními plasmatickými koncentracemi (a) či plochami pod křivkou (AUC_u) (b).

Účinek na snížení hladin cholesterolu je vyjádřen jako procentuální snížení LDL-cholesterolu v séru. ◆, ■, ▲, ● představují atorvastatin, pravastatin, fluvastatin a cerivastatin (1).

Pravastatin, cerivastatin, pitavastatin, rosuvastatin a atorvastatin jsou substráty přenašeče OATP1B1. Simvastatin a lovastatin jako lipofilní sloučeniny jsou transportovány do hepatocytů a jiných tkání převážně pasivní difúzí.

Statiny jsou vylučovány biliární sekrecí pomocí přenašečů a poté eliminovány. Hlavním přenašečem je Mrp 2 (multidrug resistance associated protein 2). Mrp 2 transporter společně s transportery zodpovědnými za up-take do jater přispívají ke specifické distribuci do jater. Za biliární exkreci statinů je však zodpovědných více transporterů (1).

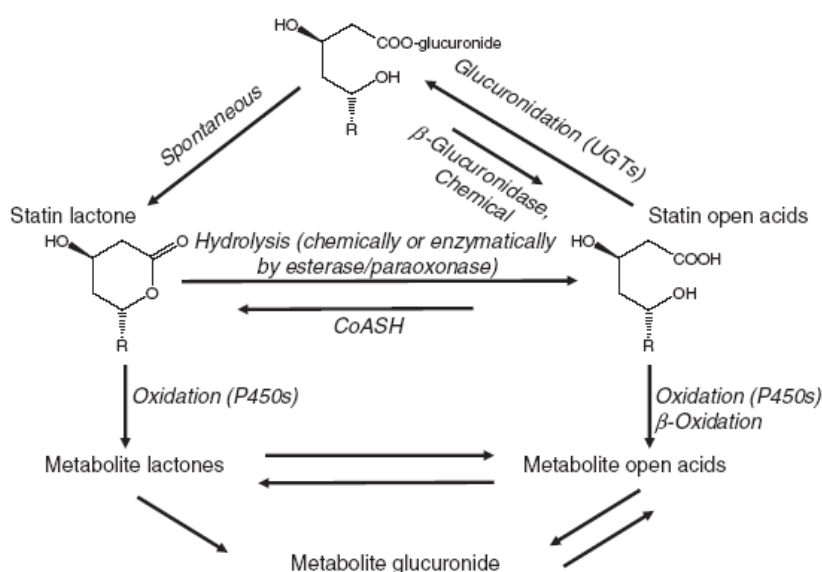
2.3.1 Metabolismus statinů

Cytochrom P450.

Statiny jsou metabolizovány jaterním mikrosomálním systémem cytochromu P450. Lipofilní statiny jsou více náchylné k oxidativnímu metabolismu na cytochromoxidázovém systému (2). V závislosti na isoformě CYP450 metabolizující daný statin mohou nastat farmakokinetické interakce s mnoha léčivy. Simvastatin, lovastatin a atorvastatin jsou převážně metabolizovány cytochromem P450 3A4 (CYP3A4). Fluvastatin jako jediný mezi statiny je metabolizován CYP2C9. Pravastatin a rosuvastatin téměř nejsou metabolizovány, a proto na této úrovni nevykazují lékové interakce. Cerivastatin je metabolizován CYP2C8 a částečně CYP3A4 (1). Všechny statiny kromě PV mají aktivní metabolity, které významnou měrou přispívají k účinku. Existuje nepřímý důkaz těchto aktivních metabolitů LV, SV a AT s delším poločasem eliminace než parentní látka, ale žádný z nich nebyl podrobněji charakterizován (2).

UDP-glukuronyltransferáza.

Statiny mohou být metabolizovány na laktony UDP-glukuronyltransferázou (UGT). Část kyselé formy statinů podobná HMG je glukuronidována pomocí UGT s následnou laktonizací acyl-glukuronidové části molekuly. Tento mechanismus laktonizace je společný pro otevřené kyselé formy statinů. Dále mohou být statiny metabolizovány několika způsoby (obr. 5): laktonizované formy mohou být konvertovány zpět na kyselé formy karboxyesterázou a následně metabolizovány či sekretovány do žluče nebo moči, nebo přímo metabolizovány CYP450 v laktonové formě. Laktonové formy jsou rychleji metabolizovány CYP450 než otevřené kyselé formy (1).



Obr. 5. Laktonizace statinů zprostředkovaná UDP-glukuronyltransferázou.

Statiny se vyznačují interkonverzí kyselých a laktonových forem a jsou metabolizovány komplexním mechanismem. Laktony jsou hydrolyzovány chemicky či enzymaticky (esterázy a paraoxonázy). Kyselé formy jsou konvertovány na laktony přes meziproduct acylglukuronid a CoASH-dependentní cestou. Deriváty acylglukuronidu a acyl-CoA mohou být zpět hydrolyzovány na kyselé formy (1).

Biliární sekrece.

Tato léčiva jsou vylučována především žlučí, z malé části močí. Lovastatin, simvastatin a jejich metabolity β-hydroxy kyseliny jsou vázané na plasmatické proteiny z 95%. Metabolity podléhají first-pass metabolismu a jsou vylučovány žlučí. Okolo 85% podané dávky bylo objeveno ve stolici a 10-15% v moči, převážně v neaktivní formě (2).

Urinární sekrece.

Vylučování statinů do moči probíhá ve velmi malém množství. Avšak pravastatin je vylučován touto cestou ze 40-47% po intravenózním podání. Urinární sekrece se účastní transportní systém, především protein OAT3 (1).

2.3.2 Intestinální absorpce

Všechny statiny se po podání rychle absorbují a dosahují maximální plasmatické koncentrace během 4 h. Současný příjem potravy zvyšuje biodostupnost lovastatinu, zatímco u pravastatinu a atorvastatinu ji snižuje. Biodostupnost simvastatinu a rosuvastatinu není potravou ovlivněna (2). Mechanismus intestinální absorpce se liší podle druhu statinu. Simvastatin a lovastatin snadno prostupují plasmatickou membránou pasivní difúzí, zatímco ostatní statiny mají specifický transportní systém. Mohou být přenášeny systémem pro monokarboxylové kyseliny (MCT), ale o tomto způsobu přenosu neexistují důkazy. Bylo prokázáno, že pravastatin je přenášen OATP2B1 proteinem. S existencí transportního mechanismu je spojena možnost lékové interakce.

Simvastatin, lovastatin, pravastatin, cerivastatin a atorvastatin jsou substráty P-glykoproteinu (P-gp). Farmakokinetika statinů, které jsou substráty P-gp, může být ovlivněna inhibitory P-gp, které zvyšují jejich biodostupnost. Nicméně biodostupnost statinů není výrazně ovlivněna vzhledem k jejich vysokým plasmatickým koncentracím. Vážná interakce s inhibitory P-gp tedy není pravděpodobná (1).

2.3.3 Enterohepatální cirkulace

Inhibitory HMG-CoA reductázy mají farmakologicky stejné účinky, nicméně rozdíly v účinnosti in vivo souvisí s distribucí a časem potřebným k dosažení jater aktivní látkou a metabolity. Studie na zvířatech ukázaly, že inhibitory HMG-CoA reductázy jsou obvykle vylučovány stolicí. Není to obvykle způsobeno nedostatečnou absorpcí, převážná většina absorbovaného léčiva a metabolitů je vylučována přednostně žlučí. Každý ze současně se vyskytujících statinů na trhu se liší množstvím aktivních metabolitů a parentní látky vylučovaných do žluči. First-pass metabolismus a biliární exkrece mohou zvýšit účinnost léčiva. Zachování aktivních složek v játrech a vrácení do enterohepatální cirkulace prodlužují účinkování léčiva. Ve studiích bylo více než 50% aktivity ve žluči spojeno s parentní látkou a aktivními metabolity.

Po perorálním podání lovastatinu nebo simvastatinu je metabolismus těchto látek založen na dynamické a vratné konverzi laktonové formy na aktivní kyselou hydroxy formu. Biliární produkty obsahují malé množství aktivní kyselé formy a metabolity, které jsou z 20 až 50% stejně účinné jako kyselá forma.

Většina biologické aktivity pravastatinu je způsobena nezměněnou látkou a zčásti metabolity s malou aktivitou. Přispění metabolitů k inhibiční aktivitě nebylo zkoumáno.

Atorvastatin je jako ostatní inhibitory HMG-CoA reductázy poměrně dobře absorbován s minimální systémovou expozicí. Je primárně vylučován trávicím traktem u potkanů i psů, přičemž biliární sekrece přispívá velkou měrou k celkovému množství. V metabolismu atorvastatinu hraje největší roli oxidativní metabolismus. Studie se psy prokazují, že existuje biliární recirkulace. Atorvastatin je velmi účinný inhibitor HMG-CoA a jeho výhodou jsou metabolity přítomné ve žluči, které jsou stejně účinné jako samotný atorvastatin. Neboť atorvastatin podléhá rozsáhlému first-pass metabolismu, jehož výsledkem jsou aktivní metabolity, které se zpět vracejí do jater, účinnost je zvýšena a účinek prodloužen. Studie po jednorázovém podání [¹⁴C] atorvastatinu u lidí prokázaly, že biliární sekrece je hlavní cestou eliminace. Atorvastatin byl rozsáhle metabolizován na ortho- a para- hydroxylované glukuronidy se stopovým množstvím atorvastatinu přítomného ve žluči, a tyto metabolity velmi pravděpodobně podléhají enterohepatální cirkulaci jako aktivní součásti.

Inhibitory HMG-CoA reductázy tedy mohou poskytnout dlouhodobý a intenzivní účinek díky jejich přeměně na aktivní metabolity, který je umocněn možností biliární recirkulace (9).

2.3.4 Distribuce

Distribuce do centrálního nervového systému.

Jedním z vedlejších účinků statinů jsou poruchy spánku. Tento účinek může vznikat na základě distribuce do centrálního nervového systému (CNS). Na druhé straně, stále více dat potvrzuje, že statiny mají potenciálně neuroprotektivní vlastnosti (ochrana endoteliálních buněk ovlivněním NO-synthasy, antioxidační, protizánětlivé a protisrážlivé účinky). Proto mohou být statiny používány i v léčbě chorob CNS. Zvýšením biodostupnosti statinů v mozku mohou být zvýšeny jejich terapeutické účinky, ale zároveň i jejich vedlejší účinky na CNS. Simvastatin a lovastatin způsobují poruchy spánku (na rozdíl od pravastatinu), neboť snadno pronikají hematoencefalickou bariérou (1).

Distribuce do kosterního svalstva.

Jedním ze závažných nežádoucích účinků statinů je myotoxicita zahrnující myopathii a rhabdomyolýzu. Podle některých studií existuje přenašeč rozpoznávající statiny exprimovaný v membránách svalových buněk. Za myotoxicitu může být zodpovědný OAT3 protein, jehož substrátem jsou statiny, zvláště méně lipofilní statiny. Nicméně nebylo prokázáno, že vychytávání statinů svalovými buňkami je zprostředkováno přenašeči (1).

2.3.5 Eliminační mechanismy a potenciální lékové interakce

Simvastatin a lovastatin.

Simvastatin a lovastatin jsou lipofilní statiny ve formě laktonů, které lehce prostupují plasmatickou membránou a jsou tedy snadno absorbovány ze střevní stěny. Po absorpci jsou hydrolyzovány na aktivní formu β -hydroxykyseliny v játrech (2). Obě formy jsou z 95% vázány na krevní bílkoviny. Podléhají v játrech first-pass metabolismu a jsou vylučovány hlavně žlučí v neaktivní formě (asi 85% dávky) (6). Jsou substráty CYP3A4 a P-gp. CYP3A4 a P-gp se nachází v játrech a střevní stěně. Tento koordinovaný systém zodpovídá za detoxikaci exogenních látek především ve střevní stěně, a proto jsou léčiva, která jsou jejich současnými substráty, metabolizována již ve střevě. Zčásti v důsledku tohoto mechanismu je biodostupnost těchto statinů nízká (< 5% pro simvastatin a 5% pro lovastatin). Inhibice CYP3A4 a/nebo P-gp může mít za následek zvýšenou absorpci léčiva a zapříčinit lékové interakce. Kromě toho může vznikat léková interakce na úrovni eliminačního procesu, neboť statiny jsou eliminovány játry (CYP3A4) (1).

Pravastatin, atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin.

Pravastatin, atorvastatin a fluvastatin jsou podávány v aktivní formě. Jsou absorbovány z gastrointestinálního traktu a podléhají v játrech first-pass metabolismu. Fluvastatin a atorvastatin jsou z více než 98%, pravastatin asi z 50% vázány na plazmatické proteiny. Léčiva jsou vylučována převážně žlučí, v menším množství močí (6). Pravastatin (a rosuvastatin) nejsou metabolizovány CYP450. Tyto statiny jsou z těla eliminovány

přenašečem zprostředkovaným exkrečním mechanismem v játrech. Neboť jsou substráty OATP1B1 proteinu, jsou z velké části vychytávány játry. U pravastatinu byl podrobně studován transportní mechanismus (obr. 6). Enterohepatální cirkulace pravastatinu přispívá ke specifické distribuci do jater. U těchto statinů se nevyskytují lékové interakce na úrovni CYP450, ale mohou vznikat interakce na úrovni transportního systému (1).

Fluvastatin.

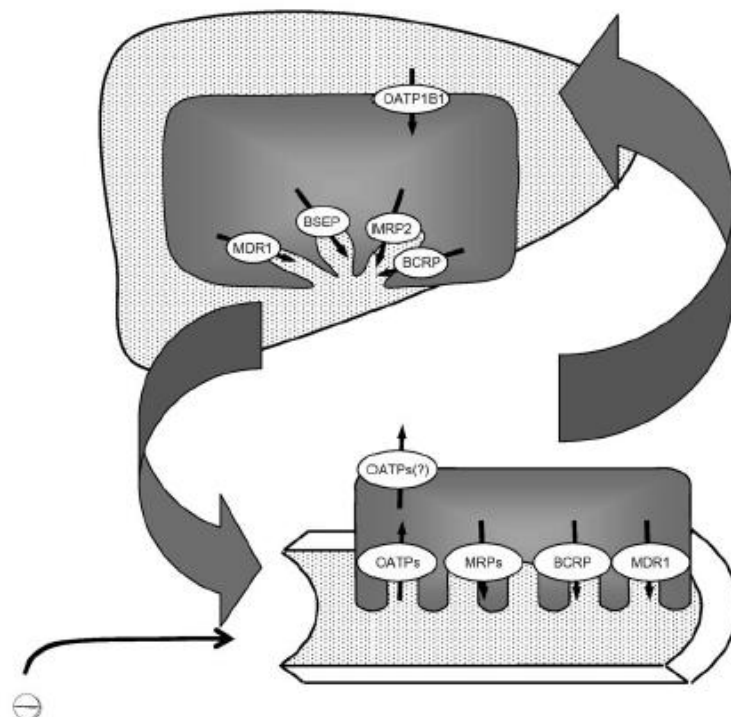
Fluvastatin je metabolizován CYP2C9 jako jediný ze statinů. Není ovlivňován inhibitory CYP3A4, ale může podléhat interakcím s léčivými metabolizovanými CYP2C9. Neboť fluvastatin má nízkou lipofilitu, je v játrech pravděpodobně vychytáván transportním systémem (1).

Cerivastatin.

Cerivastatin již není na trhu, a proto nejsou informace o jeho klinickém užívání (1).

Atorvastatin.

Atorvastatin je rovněž metabolizován CYP3A4. Nicméně tento hydrofilní statin je substrátem OATP1B1 a je aktivně vychytáván do jater. Tento transportní systém je saturabilní a je inhibován probenecidem. Clearance atorvastatinu je ovlivněna nejen mírou metabolismu, ale i mírou vychytávání v játrech. Lékové interakce mohou tedy vznikat na úrovni CYP3A4 a OATP1B1 (1).



Obr. 6. *Specifická distribuce pravastatinu do jater pomocí přenašečů v játrech a ve střevě.* Pravastatin je vychytáván v játrech přenašečem OATP1B1 a je vylučován do žluči v nezměněné formě přenašeči MRP2, BCRP, MDR1 a BSEP s největším podílem MRP2. Pravastatin se dostává do střeva, odkud je absorbován stěnou do krve pomocí přenašečů. Za intestinální absorpci je pravděpodobně zodpovědný OATP2B1 a další proteiny OATP skupiny. Většina statinů v otevřené kyselé formě je rovněž substrátem OATPs. Tyto přenašeče jsou zřejmě zahrnuty v selektivní distribuci statinů do jater (1).

2.4 Bezpečnostní aspekty

Statiny jako skupina léčiv jsou dobře snášené, nejčastější vedlejší účinky jsou gastrointestinální potíže (průjem, zácpa, bolesti břicha, nadýmání), vyrážka, závratě, pruritus a bolest hlavy. U statinů se předpokládá dlouhodobé podávání v kombinované terapii, při které se mohou častěji vyskytnout lékové interakce. Je známo, že statiny metabolizované CYP450 systémem častěji způsobují svalovou toxicitu z důvodu lékových interakcí s mnoha léčivy, která inhibují CYP450, především CYP3A4 isoformu. Lékové interakce mohou mít za následek zvýšení plasmatických hladin statinů s následným zvýšením rizika toxických účinků. Vedle běžných vedlejších účinků je u všech statinů riziko myopathie a fatální rhabdomyolýzy. Stažení cerivastatinu z klinického používání v roce 2001 upoutalo pozornost na tuto skupinu léčiv, i přestože dostupná data naznačují, že zvýšená incidence rhabdomyolýzy je specifická jen pro cerivastatin. Obvykle je počet případů myopathie nízký, ale incidence stoupá, pokud jsou statiny používány s léčivy metabolizovanými stejným enzymem. Neboť statiny se neliší ve farmakodynamických vlastnostech, jejich rozdílné farmakokinetické profily by měly tvořit racionální základ pro výběr nejvhodnějšího z nich pro kombinovanou terapii (2).

2.5 Analytické metody stanovení statinů

Přestože se statiny jeví jako strukturálně podobné, metody pro jejich stanovení v plasmě byly vyvinuty individuálně pro každý z nich, vzhledem k jejich rozdílné rozpustnosti, stabilitě a optickým vlastnostem. Ze všech publikovaných studií pouze jedna (4) zahrnovala současné stanovení simvastatinu, lovastatinu a pravastatinu (M.J. Morris, J.D. Gilbert, J.Y.-K. Hsieh, B.K. Matuszewski, H.G. Ramjit and W.F. Bayne. *Biol. Mass Spectrom.* **22**, p. 1). Pacienti jsou obvykle léčeni kombinací více látek a někteří z nich užívají více druhů antihyperlipidemik současně. Statiny však nejsou současně používány s jinými statiny během léčby, proto nevznikl požadavek na vývoj společné metody stanovení (6).

Většina metod separace statinů je založena na vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) a na plynové chromatografii (GC). HPLC je nejužívanější metoda. Všechny HPLC metody stanovení statinů jsou založeny na separaci na obrácených fázích. Nejčastěji je používána UV detekce, vzácněji fluorimetrická a hmotnostně spektrometrická detekce. Pro stanovení atorvastatinu jsou dostupné převážně metody HPLC/MS/MS, které jsou však finančně značně náročné. Při přípravě vzorku je používána LLE (extrakce do kapaliny), SPE (extrakce na pevnou fázi) či derivatizace, která potenciálně zvyšuje citlivost metody. V některých případech nejsou použity vnitřní standardy. Ve většině studií byl však vybrán jeden ze statinů jako vnitřní standard vzhledem k jejich podobné struktuře. Pouze jedna nalezená metoda (5) je založena na tenkovrstevné radiochromatografii (S.M. Singhvi, H.Y. Pan, R.A. Morrison and D.A. Willard. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **29**, p. 239) (6).

Základní informace o metodách stanovení jednotlivých statinů shrnují následující tabulky. Podrobnější údaje o literárních zdrojích lze nalézt v publikaci (6), viz seznam použité literatury.

Table 1
Assay procedures for lovastatin and metabolites

Drug, metabolites	Medium ^a (volume in ml)	Extraction ^b	Derivatization	Separation ^c stationary phases	Detection ^d	Recovery (%)	Range (ng/ml)	LOQ/LOD (ng/ml)	IS	Ref.
SVA, SV+LC, LV, LV+LC PV	P	SPE	Yes	GC Ultra 2 Methyl, 5% phenyl,	MS	82.4 SV+LC 89.89 SVA 83.7 LV+LC	0.2–20 SV, SVA 1–50 PV	0.2 LOQ SVA, SV+LC LVA, LV+LC	SVA, SV+LC LVA, LV+LC	[51]
LV	P	LLE	No	GC	MS	>92	360–48000	100 LOD	SV	[55]
LV, LVA	Mouse, Rat P	SPE	No	HPLC Kromasil C ₁₈ (5 µm)	MS (API)	54 mouse 55 rat (LV), 100 mouse 67 rat (LV+OH)	0.5–100 LV, LVA	0.5 LOQ LV, LVA	SV SVA	[56]
LV, LVA	P	SPE	No	HPLC Supelco Discovery C ₁₈ (5 µm)	UV	79–105 LV, LVA	100–5000 LV, LVA	100 LOQ LV, LVA	Bay W 62.2:0	[57]
LV	P U	LLE	No	HPLC Novapak C ₁₈	UV	73.4–82.9	500–10 000	0.5 LOQ	SV	[58]
LV	P	SPE	No	HPLC Novapak C ₁₈	UV	92.43	5–500	5 LOD	–	[59]
LV	P	LLE	No	HPLC Hypersil BDS C ₁₈	UV	101.70	2.5–80	1 LOD	–	[60]
LV, LVA	P	SPE	No	HPLC Sepalyte C ₁₈ (3 µm)	UV	85 LV 95 LVA	25–1000 LV, LVA	–	SV	[61]

LV=Lovastatin, LVA=Lovastatin acid, LV+LC=Lovastatin lactone, SV=Simvastatin, SVA=Simvastatin acid, SV+LC=Simvastatin lactone, PV=Pravastatin.

^a P=Plasma, U=Urine.

^b LLE=Liquid–liquid extraction, SPE=Solid-phase extraction.

^c HPLC=High-performance liquid chromatography, GC=Gas chromatography.

^d UV=Ultraviolet, MS=Mass spectrometric, API=Atmospheric pressure ionization, LOQ=Limit of quantitation, LOD=Limit of detection, IS=Internal standard.

Table 2
Assay procedures for simvastatin and metabolites

Drug/ metabolites	Medium ^a (volume in ml)	Extraction ^b	Derivatization	Separation ^c Stationary phases	Detection ^d	Recovery (%)	Range (ng/ml)	LOQ/LOD (ng/ml)	IS	Ref.
SV, SVA, LV, LV-LC PV	P	SPE	Yes	GC Ultra 2 methyl, 5% phenyl, (0.11 µm)	MS	82.4 SV-LC 89.9 SVA 83.7 LV-LC 78.9 LVA	0.2-20 SV, SVA 1-50 PV, LVA	0.2 LOQ SVA, SV-LC LVA, LV-LC	SVA, SV-LC LVA, LV-LC	[51]
SV	P	LLE	No	GC	MS	96-103	0.27-54	-	LV	[62]
SV, SVA	P	SPE	Yes	GC DB-1 fused-silica column	MS	54±5 SV 75±6.2 SVA	0.1-10 SV, SVA	0.1 LOQ SV, SVA	LV	[63]
SV	P	LLE	No	HPLC LiChrospher C ₁₈ (5 µm)	UV	>93.3	0.25-50	-	LV	[64]
SV, SVA	P	LLE	No	HPLC ODS Hypersil (5 µm)	UV	93.9-97.1 SV 91.4-96.2 SVA	20-1000 SV 25-1000 SVA	15 SV LOD 20 SVA	-	[65]
SV, SVA*	P	SPE	Yes	HPLC Capcell pak C ₁₈ (5 µm)	FLUO	90.9-117 SV, SVA	0.1-10 SV, SVA	0.1 LOQ SV, SVA	-	[66]
SV, SVA	P	SPE	No	HPLC Symmetry C ₁₈ (5 µm)	MS-MS (API)	≥75 SV ≥38 SVA	0.5-200 SV, SVA	0.5 LOQ SV, SVA	LV	[67]
SV, SVA	P	LLCE	No	HPLC Kromasil C ₁₈ (5 µm)	TMS	78 SV 87 SVA	0.05-50 SV, SVA	0.05 LOQ SV, SVA	Isotope-labeled SV and SVA	[68]
SV	P	LLE	No	HPLC ODS Shimpack (5 µm)	MS (ESI)	96.3-107.7	0.1-20	0.05 LOD	LV	[69]

SV=Simvastatin, SVA=Simvastatin acid, SV-LC=Simvastatin lactone, LV=Lovastatin, LVA=Lovastatin acid, LV-LC=Lovastatin lactone, PV=Pravastatin.

^a P = Plasma

^b LLE=Liquid-liquid extraction, SPE=Solid-phase extraction, LLCE=Liquid-liquid cartridge extraction.

^c HPLC=High-performance liquid chromatography, GC=Gas chromatography.

^d UV=Ultraviolet, FLUO=Fluorescence, MS=Mass spectrometric, API=Atmospheric pressure ionization, TMS=Tandem mass spectrometric, ESI=Electrospray ionization,

LOQ=Limit of quantitation, LOD=Limit of detection, IS=Internal standard * Automated method with column-switching.

Table 3
Assay procedures for pravastatin and metabolites

Drug, metabolites	Medium ^a (volume in ml)	Extraction ^b	Derivatization	Separation ^c stationary phases	Detection ^d	Recovery (%)	Range (ng/ml)	LOQ/LOD (ng/ml)	IS	Ref.
PV	P, U	LLE	No	TLRC LSS	-	88 for U	-	4.3 P LOD 300U LOD	Non-radioactive PV/Na for TLRC Automatic external standard for LSS	[54]
SVA, SV-LC, LV, LV-LC PV	P	SPE	Yes	GC Ultra 2 methyl, 5% phenyl (0.11 µm)	MS	82.4 SV-LC 89.9 SVA 83.7 LV-LC 78.9 LVA	0.2-20 SV, SVA 1-50 PV	0.2 LOQ SVA, SV-LC LVA, LV-LC	SVA, SV-LC LVA, LV-LC	[51]
PV, 3-OH and triol metabolite	S P	SPE	Yes	GC Fused-silica Chromapak, CP SIL 19 CB column (0.12 µm)	MS (NICI)	>93 PV	0-80 PV, 3-OH metabolite 0-40 triol metabolite	0.3 LOD for three compounds	Tetrahydro-PV, Dihydro-triol metabolite	[70]
PV	P	LLE	Yes	GC	MS (EII)	90	1-60	0.015 LOD	-	[71]
PV	Rat liver	SPE	No	HPLC C ₁₈	UV	80.8	-	13 LOD	-	[72]
PV	Rat muscle	SPE	No	HPLC C ₁₈	UV	52-60	5-100 ng/g rat muscle	5 ng/g LOD Rat muscle	-	[73]
PV, 3- α -iso PV	S	SPE	No	HPLC Supelcosil LC ₈ (5 µm)	UV	83.6±2.1 PV	-	2 LOD PV	Carbamazepine	[74]
PV	P	SPE	No	HPLC Purospher C ₁₈ (5 µm)	UV	69.2	2-200	2 LOQ	Trametenolone acetonide	[75]
PV	P	SPE	No	HPLC LC ₁₈ (3 µm)	UV	75	5-200	2 LOD	Methionine SV β -hydroxy acid	[76]
PV/Na, isomeric metabolite	U	SPE	No	HPLC Alkylphenyl column (5 µm)	UV	-	<1500 for two compounds	0.1 LOD for two compounds	9-fluoro-11 β - hydroxy-16 α , 17 α -(1-methyl ethylideneoxy) oxocandistera-1,4-diene- 17-carboxylic acid	[77]

Table 3. Continued

Drug/ metabolites	Medium ^a (volume in ml)	Extraction ^b	Derivatization	Separation ^c stationary phases	Detection ^d	Recovery (%)	Range (ng/ml)	LOQ/LOD (ng/ml)	IS	Ref.
PV	P	IMAE	Yes	HPLC Column switching 300-C ₄ column Cosmosil column A5 C ₁₈ -AR	LFLLUO	63	0.5–100	0.1 LOD	R-416	[78]
PV, PV-d ₃ PV-LC	S	SPE	No	HPLC Keystone Betasil ODS (5 µm)	MS-MS (APCI)	>90 for 5 analyte	0.5–100 for 5 analyte	0.5 LOQ for five analytes	PV-d ₃ for PV/PV-d ₃ SQ-31906, SQ-31906-d ₃ , PV-LC-d ₃ for PV-LC	[79]
SQ-31906 (3- α -iso PV) SQ-31906-d ₃										
PV, main metabolite R-416 (3- α -iso PV)	P	SPE	No	HPLC Inertsil ODS-2 column, (5 µm)	MS (APCI)	–	0.625–80 PV, R-416	0.625 LOQ PV, R-416	R-1437	[80]
PV, SQ-31906 (3- α -iso PV)	Rat P Human S Mouse S	Method B SEC	No	HPLC Method A Oasis column Method B (30 µm)	MS-MS (APCI)	Method A 80	Method A 1–1000	Method A 1 LOQ Method B 0.5 LOQ	PV-d ₃	[81]
	Rat S Monkey S Mouse liver			Method B Waters Symmetry C ₁₈ (5 µm)		50 PV 90 SQ-31906	Method B 0.5–100			
PV	P	SPE	No	HPLC Zorbax XDB C ₈ (5 µm)	MS (NITMS)	90.5	0.25–300	0.25 LOQ	β -OH-LV	[82]

SV=Simvastatin, SVA=Simvastatin acid, SV-LC=Simvastatin lactone, LV=Lovastatin, LVA=Lovastatin acid, LV-LC=Lovastatin lactone, PV=Pravastatin, PV-LC=Pravastatin lactone.

^a P=Plasma, U=Urine, S=Serum.

^b LLE=Liquid–liquid extraction, SPE=Solid-phase extraction, SEC=Sample extraction, IMAE=Immobilized antibody extraction.

^c HPLC=High-performance liquid chromatography, GC=Gas chromatography, TLC=Thin-layer radio chromatography, LSS=Liquid scintillation spectrometry.

^d UV=Ultraviolet, FLUO=Fluorescence, LFLLUO=Laser induced fluorescence, MS=Mass spectrometric, API=Atmospheric pressure ionization, APCI=Atmospheric pressure chemical ionization, NCI=Negative ion chemical ionization, EII=Electron impact ionization, NITMS=Negative ion tandem mass spectrometric, LOQ=Limit of quantitation, LOD=Limit of detection, I.S.=Internal standard.

Table 4
Assay procedures for fluvastatin and metabolites

Drug, metabolites	Medium ^a (volume in ml)	Extraction ^b	Derivatization	Separation ^c stationary phases	Detection ^d	Recovery (%)	Range (ng/ml)	LOD/LOQ (ng/ml)	IS	Ref.
FV:Na	P	LLE	No	HPLC Supercosil LC-18 (5 µm)	FLUO	-	1-1000	1 LOD	Sandoz compounds* 63-267	[83]
FV:Na, racemate enantiomers	P	LLE	No	HPLC Zorbax Rx-C ₈ (5 µm) Chiralcel OD-R (10 µm)	FLUO	95 racemates 86 racemates	10-5000 mmol/l racemates 5-1200 mmol/l enantiomers	0.5 mmol/l (LOQ) racemates 5 mmol/l (LOQ) enantiomers	Sandoz compounds*	[84]
FV isomers [(-)-(3S,5R), (+)-(3R, 5S)]	P	SPE	No	HPLC Chiralcel OD-H	FLUO all compounds	>80 all compounds	0.75-625	0.75 (LOQ)		[85]
FV, metabolites (M-2, M-3, M-4, M-7)	P	SPE (system 1) LLE (system 2)	No	HPLC ODS (5 µm)	UV	92.7-102.5 M-2 94.4-142.3 M-3 94.2-10.5 M-5 67.8-102.8 M-4 67.8-102.8 M-7 89.4-97.3 FV	10-1000 all compounds	10 LOQ all compounds	Benzophenone (system 1) 9-cyanoanthracene (system 2)	[86]

FV=Fluvastatin, * Sandoz compound 63-267=[R*,S*,-(E)]-(±)-7-[3,4-fluorophenyl]-1-(1-methylethyl)-1H-indol-2yl]-3,5-dihydroxy-6-methyl-6-heptenoic acid, monosodium salt

^a Plasma

^b LLE=Liquid-liquid extraction, SPE=Solid-phase extraction.

^c HPLC=High-performance liquid chromatography.

^d UV=Ultraviolet, FLUO=Fluorescence, LOQ=Limit of quantitation, LOD=Limit of detection, IS.=Internal standard.

Table 5
Assay procedures for atorvastatin and metabolites

Drug metabolites	Medium ^a (volume in ml)	Extraction ^b	Derivatization	Separation ^c stationary phases	Detection ^d	Recovery (%)	Range (ng/ml)	LOD/LOQ (ng/ml)	IS	Ref.
AVA, 2-OH-AV, 4-OH-AV AV-LC	S	LLE	No	HPLC YMC Basic, C ₁₈ (5 µm)	MS-MS (API)	60–100 for all compounds	0.5–200 for all compounds	0.5 LOQ for all compounds	A deuterium labeled analogs	[52]
AV, o-OH-AV, p-OH-AV	Human, dog, rat P	LLE	No	HPLC YMC J'Sphere H80, C ₁₈ (4 µm)	TMS	100–102 AV 70.6–104 o-OH-AV 47.6–85.6 p-OH-AV	0.25–25 for all compounds	0.25 LOQ for all compounds	[d ₂]-AV [d ₂]-o-OH-AV	[53]

AV=Atorvastatin, AVA=Atorvastatin acid, AV-LC=Atorvastatin lactone.

^a S=Serum, P=Plasma.

^b LLE=Liquid-liquid extraction.

^c HPLC=High-performance liquid chromatography.

^d MS=Mass spectrometric, API=Atmospheric pressure ionization, TMS=Tandem mass spectrometric, LOQ=Limit of quantitation, LOD=Limit of detection, IS=Internal standard.

2.5.1 Podmínky validace bioanalytické metody současného stanovení analytů podléhajících interkonverzi *ex vivo* (7)

V praxi se často analytik setkává se vzorky s obsahem látek, které mohou vzájemně konvertovat během stanovení. Interkonverze může nastat během přípravy vzorku před odebráním alikvotních podílů, během extrakce, odpařování dosucha či v rekonstitučním roztoku. Mezi takové látky patří *inhibitory HMG-CoA reduktázy*, jako lovastatin a simvastatin. Tato léčiva jsou podávána ve formě laktonů, ale biologické vzorky obsahují laktonové i otevřené formy hydroxykyselin. Atorvastatin je naopak podáván ve formě hydroxykyseliny, avšak biologické vzorky obsahují otevřenou i laktonizovanou formu. Udržováním *pH vzorků na 4-5* lze interkonverzi minimalizovat. Při zvýšení pH nad 6 je usnadněna konverze laktonizovaných forem na kyseliny (v ionizované formě); při sníženém pH je zvýšena konverze kyselin na laktony či laktonů na kyseliny (v neionizované formě).

Další kategorií jsou vzorky obsahující *léčiva ve formě karboxylových kyselin* a odvozené *acylglukuronidy*. Acylglukuronid může být hydrolyzován zpět na léčivo. Hydrolýzu lze opět omezit úpravou pH vzorku na 3-4. Rovněž *thioly a disulfidy* mohou podléhat konverzi v závislosti na pH vzorku; thioly jsou stabilní při nižším pH. Čtvrtou kategorií podléhající *ex vivo* konverzi jsou *léčiva mající isomerní produkt biotransformace* (např. E- a Z-isomer methyloximů). Patří sem také všechna *proléčiva*. Podmínky pro snížení stupně konverze proléčiva budou záviset na funkční skupině použité pro tvorbu tohoto proléčiva.

Při vývoji metody pro stanovení těchto léčiv musí být zvoleny podmínky zajišťující minimální stupeň konverze. Konverzi však nelze zcela zabránit ani za optimálních podmínek. Proto je třeba navrhnout vhodnou koncentraci léčiv (poměr koncentrace jednoho analytu ke druhému) v kontrolních a standardních vzorcích tak, aby výsledky měření kontrolních vzorků byly koherentní s výsledky měření testovaných vzorků. V ideálním případě by mělo být složení kontrolních vzorků shodné se složením měřených vzorků. V raném stadiu vývoje léčiva však není jeho koncentrace v biologických vzorcích známá, a navíc se může v různých vzorcích lišit v závislosti na čase odběru vzorku. Za těchto okolností je složení kalibračních a kontrolních vzorků zásadním faktorem.

U mnoha metod není překvapivě tato skutečnost diskutována, a při přípravě kontrolních vzorků není zohledňována. Na modelu sloučenin hydroxykyseliny a její laktonizované formy byl zkoumán vliv složení kontrolních vzorků a podmínek analýzy na stupeň konverze léčiva ve vzorcích plasmy. Jako modelové sloučeniny byly použity pravastatin a pravastatin lakton, a isotopově značené analogy jako vnitřní standardy.

Přístrojové vybavení.

Pro stanovení byl použit hmotnostní spektrometr Finnigan (San Jose, CA) TSQ-7000 a dvě separační C₁₈ kolony s velikostí částic 5 μm (Waters, Milford, MA) 3.9 × 50 a 4.6 × 150 mm. Jako extrakční předkolona byla použita Waters Oasis HLB kolona (30 μm, 1 × 50 mm).

Standardní a kontrolní vzorky.

Zásobní roztoky pravastatinu a vnitřního standardu byly připraveny zvlášť ve směsi voda:acetonitril (10:90, v/v). Zásobní roztoky pravastatin laktonu a vnitřního standardu byly připraveny také zvlášť v acetonitrilu. Roztok vnitřního standardu I obsahoval oba vnitřní standardy v 0.1 M roztoku octanu amonného (pH 3.8). Roztok vnitřního standardu II obsahoval oba vnitřní standardy v 0.2 M roztoku octanu amonného (pH 6.8).

Kalibrační křivka byla sestrojena v koncentračním rozmezí 5-500 ng/ml pro oba analyty. Kontrolní vzorky obsahovaly pravastatin, pravastatin lakton nebo oba analyty v různém vzájemném zastoupení.

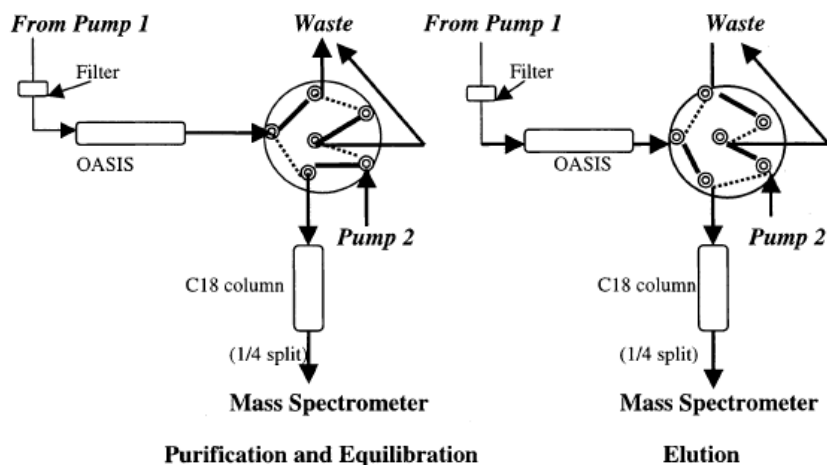
Podmínky interkonverze a příprava vzorku.

Standardní a kontrolní vzorky byly analyzovány po přímém nástřiku do systému po úpravě za různých podmínek.

V prvním případě (1) byly vzorky připravovány v ledové lázni a analyzovány ihned po přidavku roztoku vnitřního standardu I, kterým bylo sníženo pH na 4.2, a tím minimalizován stupeň konverze. Ve druhém případě (2) byly vzorky ponechány 4 h při pokojové teplotě bez úpravy pH (pH vzorku bez úpravy 7.3) za účelem zvýšení hydrolýzy. Před analýzou byl přidán roztok vnitřního standardu I, kterým bylo sníženo pH vzorku na 4.2. Ve třetím případě (3) bylo pH vzorků upraveno na pH 1.8 směsí kyseliny chlorovodíkové a roztoku chloridu sodného. Poté byly vzorky homogenizovány 2 h při pokojové teplotě za účelem zvýšení konverze. Před analýzou byl přidán roztok vnitřního standardu II, kterým bylo pH zvýšeno na 4.2.

Chromatografické a spektrometrické podmínky.

Byl použit on-line purifikační systém bez předchozí extrakce vzorku (obr.7). Vzorky plasmy upravené způsoby (1) a (2) byly dávkovány na kolonu Oasis HLB, která byla promyta 10 mM vodným roztokem mravenčanu amonného (pH 4.5); odtok mobilní fáze byl směřován do odpadu. Poté byl tok nasměrován na C₁₈ analytickou kolonu (3.9 × 50 mm, 5 μm) a mobilní fáze změněna na roztok mravenčanu amonného (pH 4.5)-acetonitrilu (60:40, v/v); tok mobilní fáze byl směřován do hmotnostního spektrometru. Po nasměrování odtoku zpět do odpadu byl systém postupně promyt acetonitrem a 10 mM vodným roztokem mravenčanu amonného (pH 4.5) (ustálení toku mobilní fáze). Celkový čas analýzy byl 6.0 min (gradientová eluce). Vzorky plasmy upravené způsobem (3) byly analyzovány za stejných podmínek na analytické koloně (4.6 × 150 mm, 5 μm). Hmotnostní spektrometr byl přepnut z negativního na pozitivní režim v 3.8 min v případech (1) a (2) a v 5.5 min v případě (3). Byly detekovány [M-H]⁻ prekurzorové ionty pravastatinu a [M+NH₄]⁺ prekurzorové ionty pravastatin laktonu.



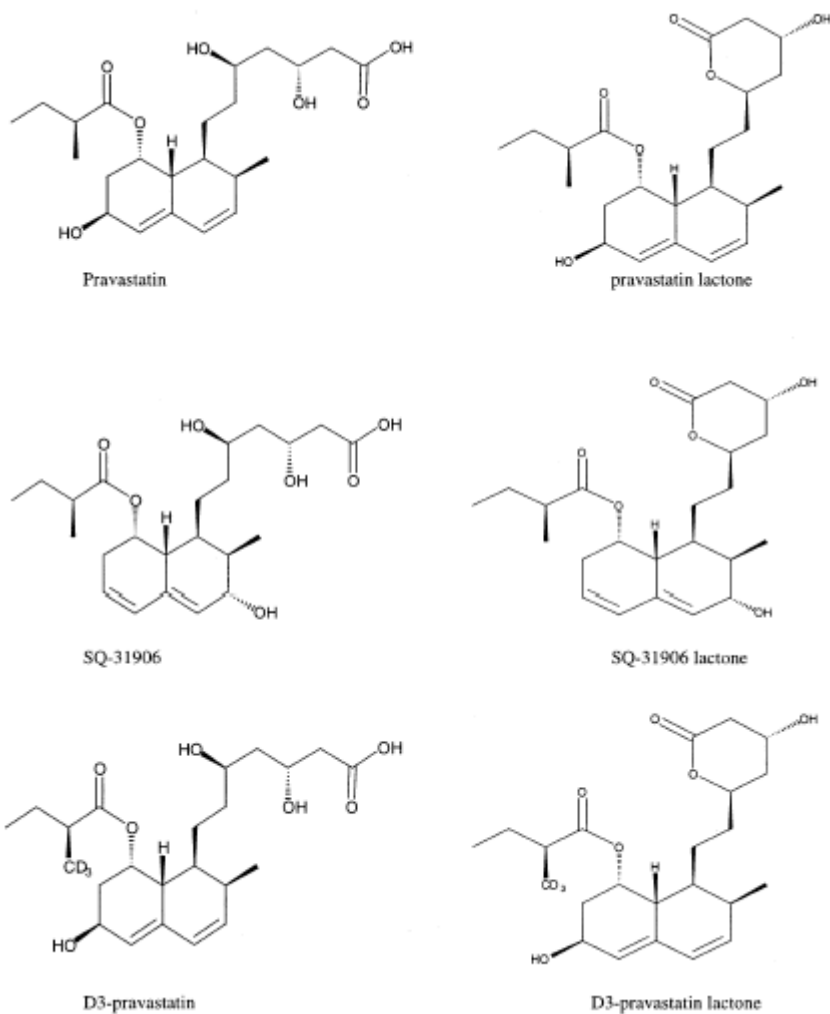
Pozn. Čerpadlo 1 zajišťuje gradientovou eluci. Čerpadlem 2 protéká isokratická mobilní fáze rychlostí 0.8 ml/min o složení 10 mM vodný roztok mravenčanu amonného (pH 4.5)-acetonitril (60:40, v/v) pro (1) a (2); (50:50, v/v) pro (3).

Steps of on-line purification	Time range	Divert valve position
Purification step	0-1 min	Divert valve switched to waste
Elution step	1-4.9 (1-7.0) min	Divert valve switched to MS
Equilibration step	>4.9 (>7.0) min	Divert valve switched back to waste
Total run time	6 (8) min	

Údaje v závorce platí pro (3).

Obr. 7. Schematické znázornění on-line purifikačního systému (7).

Hlavním cílem bylo demonstrovat vliv stupně konverze analytů na správnost a přesnost stanovení. Jako modelové sloučeniny byly použity pravastatin (karboxylová kyselina s δ -hydroxylovou skupinou) a pravastatin lakton (δ -lakton odvozený od kyseliny). Pro vzorky upravené způsobem (3) byla použita delší separační kolona (4.6×150 mm, $5 \mu\text{m}$), za účelem oddělení pravastatinu a pravastatin laktonu od jejich isomerů vzniklých v kyselém prostředí (obr.8).



Obr. 8. Chemické vzorce pravastatinu, pravastatin laktonu, isomerů SQ-31906 a SQ-31906 laktonu, D3-pravastatinu a D3-pravastatin laktonu (7).

Analýza kontrolních vzorků obsahujících pouze jeden z analytů.

Za podmínek (1) nebyla pozorována konverze pravastatinu na pravastatin lakton ani naopak, neboť pH plasmy bylo udržováno na 4.2. Za podmínek (2) byl pravastatin lakton hydrolyzován na pravastatin. V kyselém prostředí (3) vzniklo několik produktů nežádoucích reakcí. Pravastatin poskytl v důsledku intramolekulární esterifikace pravastatin lakton a zároveň vznikl jeho polohový isomer (SQ-31906), obr. 8. Pravastatin lakton byl hydrolyzován na pravastatin a zároveň vznikly isomery SQ-31906 a SQ-31906 lakton. Přitom stejné produkty byly získány při použití kontrolních vzorků obsahujících pouze pravastatin nebo pravastatin lakton.

U vzorků upravených způsobem (2) byla pozorována hydrolyza laktonů. Tyto podmínky měly napodobit reálnou situaci, kdy během úpravy vzorku je jeden analyt konvertován na druhý. Nejlepších výsledků bylo dosaženo se vzorky, u nichž byl poměr koncentrací analytů shodný s poměrem koncentrací u kalibračních standardů (poměr 1:1). U vzorků majících poměr koncentrací analytů odlišný nebylo možné spolehlivě stanovit *pravastatin*. Kontrolní vzorky obsahující pouze laktonizované formy a vzorky mající poměr koncentrací analytů 1:10 vykazovaly pozitivní odchylky, zatímco vzorky obsahující pouze pravastatin a vzorky mající

poměr koncentrací analytů 10:1 vykazovaly negativní odchylky. Na druhé straně bylo možné spolehlivě stanovit pravastatin lakton ve všech kontrolních vzorcích s poměrem koncentrací odlišným od 1:1. Z toho vyplývá, že při jednostranné konverzi, kdy je substrát (pravastatin lakton) přeměňován na produkt (pravastatin), lze tento produkt spolehlivě stanovit pouze v případě, že poměr koncentrací analytů v kontrolních vzorcích je shodný s poměrem jejich koncentrací ve standardních vzorcích. Na druhé straně, substrát lze spolehlivě stanovit pouze pokud jsou poměry koncentrací analytů v kontrolních a standardních vzorcích různé. Nejlepších výsledků v případě (3) bylo dosaženo se vzorky, u nichž byl poměr koncentrací analytů shodný s poměrem koncentrací analytů u kalibračních standardů (poměr 1:1). Pravastatin bylo možné spolehlivě stanovit v kontrolních vzorcích obsahujících pouze pravastatin a ve vzorcích s poměrem analytů 10:1. V tomto případě byl konečným důsledkem konverze úbytek pravastatinu; to znamená, že pravastatin má roli substrátu a lze ho spolehlivě stanovit za výše uvedených podmínek na základě úvahy uvedené v případě (2). Naopak pravastatin nebylo možné spolehlivě stanovit v kontrolních vzorcích obsahujících pouze laktonizované formy a ve vzorcích s poměrem analytů 1:10. Naměřené koncentrace vykazovaly pozitivní odchylky. V tomto případě byl konečným důsledkem vzrůst koncentrace pravastatinu; to znamená, že pravastatin je produktem a jeho stanovení je ovlivněno výše uvedenými podmínkami.

Naopak, pravastatin lakton bylo možné spolehlivě stanovit za opačných podmínek; tedy v kontrolních vzorcích obsahujících pouze pravastatin lakton a ve vzorcích s poměrem analytů 1:10. Pravastatin lakton nebylo možné spolehlivě stanovit v kontrolních vzorcích obsahujících pouze pravastatin a ve vzorcích s poměrem analytů 10:1. Naměřené koncentrace vykazovaly pozitivní odchylky.

Je zřejmé, že kontrolní vzorky obsahující dva analyty ve stejném poměru koncentrací jako standardní vzorky, poskytují spolehlivé výsledky stanovení pro oba analyty za všech podmínek, včetně podmínek usnadňujících jejich vzájemnou konverzi. Na druhé straně, kontrolní vzorky, u nichž je poměr koncentrací analytů odlišný od jejich koncentrací ve standardních vzorcích, poskytují spolehlivé výsledky pouze za podmínek, že nenastává interkonverze. Za podmínek umožňujících interkonverzi budou získány nesprávné výsledky nejméně pro jeden z analytů. Z toho vyplývá, že metoda validovaná pro stanovení dvou analytů používající standardní vzorky obsahující analyty v poměrných koncentracích 1:1 a kontrolní vzorky se stejným poměrem koncentrací analytů 1:1, by měla být aplikována při stanovení těchto analytů v biologickém materiálu jen pokud se zde nacházejí ve stejném poměru koncentrací. Aby byla ověřena účinnost metody u všech vzorků, je nutné, aby kontrolní vzorky pokryly celé koncentrační rozmezí vyskytující se v biologických vzorcích.

Při vývoji metody stanovení analytů podléhajících vzájemné konverzi je *prvním krokem* výběr takových podmínek, které eliminují nebo minimalizují interkonverzi. Při volbě takových podmínek, které eliminují či minimalizují přeměnu jednoho analytu na druhý, budou podmínky příznivější pro ten z analytů, který se nachází v biologickém materiálu v převažujícím množství. *Druhým krokem* je racionální výběr složení kontrolních vzorků vzhledem ke složení standardních vzorků. Pro validaci metody je doporučena následující sestava standardních a kontrolních vzorků: 1:1 standardní vzorky v celém kalibračním rozmezí; 1:1 kontrolní vzorky s nízkou koncentrací; 1:1 kontrolní vzorky se střední koncentrací; 1:1 kontrolní vzorky s vysokou koncentrací; kontrolní vzorky obsahující pouze analyt 1; 10:1 kontrolní vzorky; kontrolní vzorky obsahující pouze analyt 2; a 1:10 kontrolní vzorky. Měly by být zahrnuty poměry koncentrací analytů odlišné od 1:10 a 10:1 v závislosti na očekávaných poměrech koncentrací v biologických vzorcích.

Závěr publikované práce.

Výsledky prokázaly, že metodou nelze získat přesné a správné výsledky, pokud se poměr koncentrací analytů (δ -hydroxykyseliny/ δ -laktonu) v kontrolních vzorcích liší od poměru koncentrací ve standardních vzorcích a zároveň podmínky analýzy usnadňují interkonverzi. Pokud je poměr koncentrací analytů v kontrolních vzorcích shodný s poměrem koncentrací ve standardních vzorcích, jsou získány přijatelné výsledky i za podmínek zvýšeného stupně interkonverze. Je to proto, že stupeň konverze je stejný v kontrolních i standardních vzorcích.

Podmínky stanovení léčiv podléhajících interkonverzi by měly zajistit eliminaci či snížení jejího stupně. Navíc, složení kontrolních vzorků by mělo být pečlivě zváženo vzhledem ke složení standardních vzorků. Protože kontrolní vzorky slouží k ověření účinnosti metody, měly by svým složením pokrývat celé spektrum předpokládaných koncentrací v biologickém materiálu. Další podrobné údaje jsou uvedeny v publikaci (7).

2.5.2 Stabilita statinů (laktonů a hydroxykyselin) v roztocích (3)

Ve studii na stabilitu tří přirozených statinů lovastatinu, simvastatinu a pravastatinu byla jako nejvhodnější mobilní fáze pro HPLC separaci určena směs *acetonitril/voda/octová kyselina (70/30/0.5, v/v)*. V této směsi statiny zachovávají svou původní strukturu nejdéle i za běžné teploty. Stabilita standardních látek statinů byla zkoumána v methanolu, ethylacetátu, 70% acetonitrilu (s nebo bez přídavku 0.5% octové kyseliny) a ve 100 °C vodě po různou dobu. Laktony byly stabilní v čistém methanolu a ethylacetátu po dobu 48 h při pokojové teplotě. Při skladování v methanolu vzrůstá s časem riziko methanolýzy spojené se vznikem methylesterů. V 70% acetonitrilu a 100 °C vodě jsou laktony konvertovány na příslušné hydroxykyseliny ve stoupajícím množství v závislosti na čase. Hydroxykyseliny jsou na rozdíl od laktonů stabilní a nepodléhají žádným reakcím. Ye et al. zkoumali přeměnu lovastatinu na lovastatin-hydroxykyselinu v plasmě při 37 °C, pokojové teplotě, -20 °C a -70 °C. Kompletní přeměna nastala za 21.5 h při 37 °C a za 121.5 h při pokojové teplotě; při -20 °C a -70 °C nebyl lovastatin významněji rozkládán po 4 měsíce (3).

2.5.3 Konverze statinů z forem laktonu na odpovídající formy hydroxykyselin v alkalických podmínkách (3)

Konverze laktonů na příslušné hydroxykyseliny lze například využít při přípravě standardních látek hydroxykyselin. Brown et al. a Shen et al. připravili statiny ve formě hydroxykyselin z jejich laktonů přídavkem 0.1N vodného roztoku NaOH a 0.05N KOH ve vodném methanolu. Deng-Jye Yang et al. zjistili, že lovastatin a simvastatin (laktony) mohou být kompletně konvertovány na hydroxykyseliny v 0.1N NaOH a 0.05N KOH (ve 25–90% vodném methanolu), nicméně později mohou být přeměněny na methylestery ve zvyšujícím se množství se stoupajícím podílem methanolu. V 0.1N NaOH nebo 0.05N KOH roztoku ve 25% methanolu bylo přítomno pouze 5% esterové formy lovastatinu (Lov-M) vzniklé z lovastatinu. Při použití 90% methanolu již bylo nalezeno 15% Lov-M. Simvastatin vykazoval podobné výsledky. Shen et al. a Maio a Metcalfe potvrdili, že může nastat methanolýza laktonové formy statinů či esterifikace hydroxykyselin v prostředí methanolu. Ve vodném prostředí dosáhla konverze laktonů na hydroxykyseliny pouze hodnoty 90–93%.

Je to pravděpodobně způsobeno nerozpustností lovastatinu a simvastatinu ve vodě. Proto byly alkalické roztoky připraveny ve 25, 50, 75 a 90% vodném acetonitrilu. Stupeň konverze byl podobný v 0.1N NaOH a 0.05N KOH, přičemž téměř kompletně byly laktony přeměněny pouze v *alkalických roztocích s 25 nebo 50% vodným acetonitrilem*. Zdá se, že alkalické roztoky obsahující nižší koncentraci acetonitrilu usnadňují konverzi. Zřejmě je důležitý jak dostatek vody, tak dostatečná rozpustnost pro kompletní přeměnu laktonu na hydroxykyselinu.

Formy laktonů tedy mohou být kompletně konvertovány na hydroxykyseliny pouze v roztocích *0.1N NaOH nebo 0.05N KOH připravených ve 25 nebo 50% vodném acetonitrilu*. Ve všech methanolických zásaditých roztocích laktony rovněž kompletně hydrolyzují, později jsou ale přeměněny na methylestery hydroxykyselin, jejichž procento stoupá se zvyšujícím se podílem methanolu (3).

2.5.3 Chromatografické a spektrometrické podmínky LC/MS/MS metod stanovení laktonů a hydroxykyselin v biologických vzorcích (8)

Je známo, že bioanalytické LC/MS/MS metody stanovení léčiv, které obsahují určité funkční skupiny, v sobě musí zahrnovat takové chromatografické postupy, které zajistí, aby metabolity či proléčiva přítomné v biologickém vzorku nepřispívaly k odpovědi v SRM kanálech

používaných ke stanovení vlastního léčiva. Do této kategorie patří léčiva:

- a) obsahující karboxylovou skupinu, ze které může in vivo vznikat acylglukuronid jako metabolit,
- b) obsahující laktonový kruh, který se in vivo metabolizuje na karboxylovou kyselinu,
- c) hydroxy karboxylové kyseliny, ze kterých mohou in vivo vznikat laktony,
- d) obsahující amino-skupinu, ze které může in vivo vznikat N-oxid.

Tyto metabolity podléhají v analytickém systému konverzi na prekurzorový ion v SRM používaný ke stanovení léčiva. V důsledku toho může být stanovená koncentrace léčiva vyšší než skutečná, pokud nebyly zajištěny vhodné separační podmínky pro léčivo a metabolit. Jsou ale zvláštní případy analýzy léčiva ve formě laktonu a jeho metabolitu (hydroxykyseliny) či naopak, kdy je nutná chromatografická separace nebo hmotnostní rozlišení mezi léčivem a jeho metabolitem i přes absenci vzájemné konverze. Jednoznačnou vlastností laktonu a odpovídající hydroxykyseliny je rozdíl 18-ti hmotnostních jednotek mezi nimi, který je jen o jednotku vyšší než rozdíl mezi $[M+H]^+$ a $[M+NH_4]^+$ ionty obou analytů (17 hmotnostních jednotek). Tento fakt má závažné důsledky pro přesné stanovení laktonu jako léčiva v přítomnosti jeho metabolitu či naopak. V této studii byl použit simvastatin jako lakton a simvastatin kyselina.

Příprava vzorků.

Zásobní roztok simvastatinu byl připraven z acetonitrilu, vzorky byly připraveny ředěním zásobního roztoku acetonitrilem. Zásobní roztok simvastatin kyseliny byl připraven ve směsi acetonitrilu a vody (1:9), vzorky ředěním zásobního roztoku acetonitrilem.

Chromatografie.

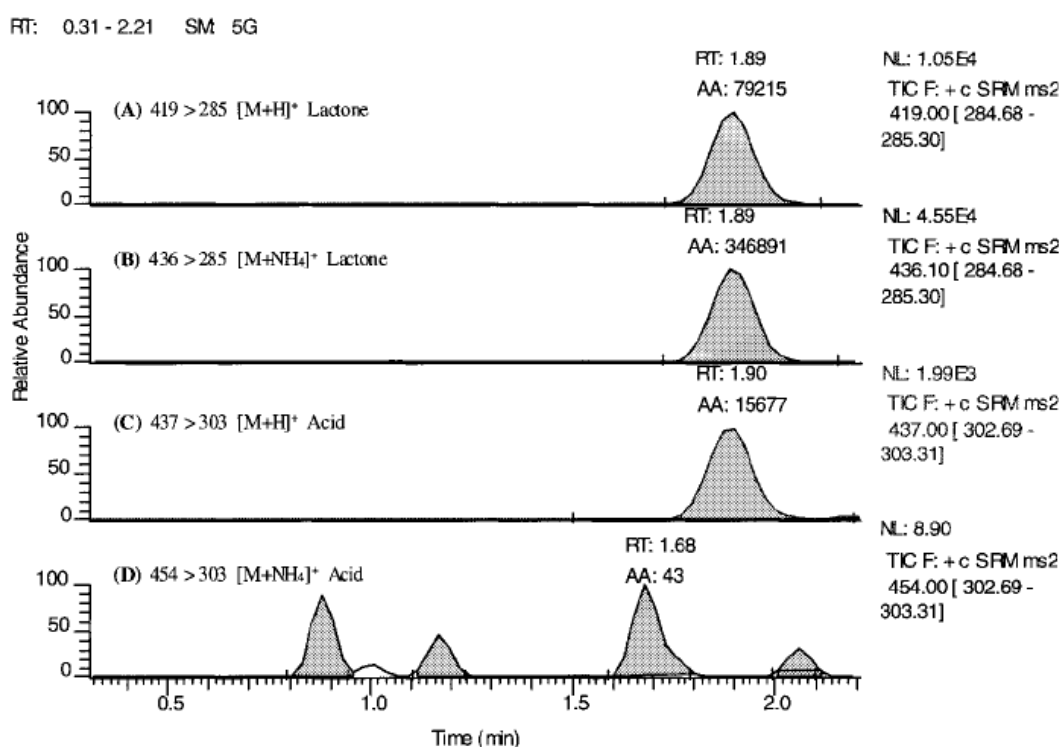
Byla provedena isokratická eluce kombinací 25% mobilní fáze A (roztok 10 mM ammonium acetátu ve vodě o pH 4,0 upraveným kyselinou mravenčí) a 75% mobilní fáze B (1 mM roztok mravenčí kyseliny v acetonitrilu (zdánlivé pH 3,7)).

Spektrometrické podmínky.

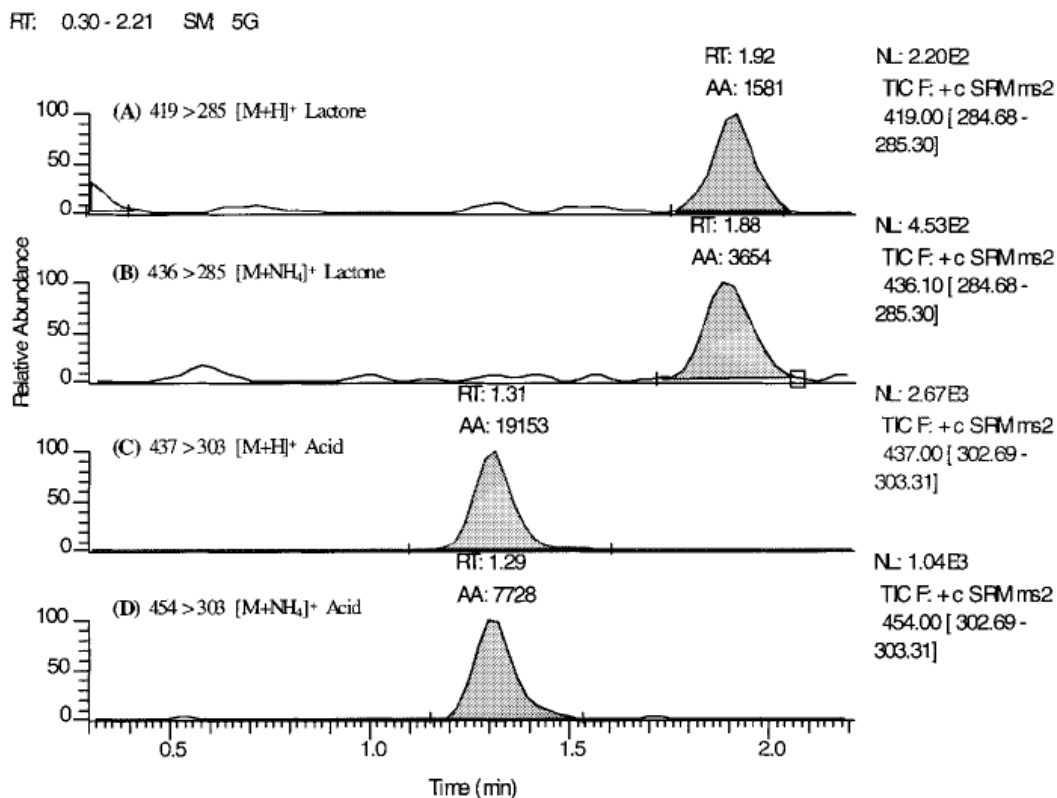
Hmotnostní spektrometr pracoval v pozitivním režimu. SRM spektra byla získána v podmínkách LC (25% mobilní fáze A a 75% mobilní fáze B), při kterých proběhlo základní rozdělení mezi simvastatin kyselinou a simvastatinem s retenčními časy 1,3 a 1,9 min. $[M+H]^+$ a $[M+NH_4]^+$ prekurzorové ionty byly použity pro oba analyty. Byly sledovány čtyři SRM kanály, dva pro lakton a dva pro kyselinu. Kanály pro lakton tvořily $[M+H]^+$ kanál (m/z 419 \rightarrow 285) a $[M+NH_4]^+$ kanál (m/z 436 \rightarrow 285). Kanály pro kyselinu tvořily $[M+H]^+$ kanál (m/z 437 \rightarrow 303) a $[M+NH_4]^+$ kanál (m/z 454 \rightarrow 303).

Je známo, že $[M+NH_4]^+$ ionty mohou vznikat i při použití mobilní fáze voda/acetonitril, která obsahuje neznámé zdroje amoniových iontů. V této studii byl záměrně do mobilní fáze přidán amonium acetát, vzhledem ke zjištění, že SRM spektra zahrnují i tento ion jako prekurzor. Simvastatin a simvastatin kyselina vykazovaly stejně rozsáhlé odpovědi pro oba ionty $[M+H]^+$ a $[M+NH_4]^+$.

4 SRM chromatogramy představující dva kanály pro lakton a dva pro kyselinu získané u vzorku simvastatinu a simvastatin kyseliny jsou na následujících obrázcích.



Obr. 9. SRM chromatogramy vzorku simvastatinu (8).



Obr. 10. SRM chromatogramy vzorku simvastatin-hydroxykyseliny (8).

Kanál A, první kanál pro lakton či $[M+H]^+$ kanál pro lakton (m/z 419 \rightarrow 285).

Vzorek simvastatinu poskytl široký pík v retenčním čase simvastatinu (1,89 min) a neposkytl žádný pík v retenčním čase kyseliny (1,31 min) (obr. 9). Vzorek simvastatin kyseliny poskytl malý pík v retenčním čase simvastatinu (obr. 10). Tento pík, který tvoří přibližně 2% píku laktonu vzorku simvastatinu (obr. 9), je způsoben malým množstvím simvastatinu přítomným ve vzorku simvastatin kyseliny. Vzorek simvastatin kyseliny neposkytl téměř žádný pík v retenčním čase kyseliny, to znamená že laktonizace kyseliny téměř neprobíhá. Zkombinováním výsledků analýzy obou vzorků ukazuje, že kanál A je selektivní pro lakton a neodpovídá kyselině. Proto tento kanál může být použit pro přesné stanovení laktonu v přítomnosti kyseliny i bez chromatografické separace. Separace by byla požadována, jestliže by byla zjištěna laktonizace kyseliny.

Kanál B, druhý kanál pro lakton či $[M+NH_4]^+$ kanál pro lakton (m/z 436 \rightarrow 285).

Výsledky byly shodné s kanálem A. Tento kanál opět slouží k přesnému stanovení laktonu bez chromatografické separace, pokud neprobíhá laktonizace.

Kanál C, první kanál pro kyselinu či $[M+H]^+$ kanál pro kyselinu (m/z 437 \rightarrow 303).

Vzorek simvastatin kyseliny poskytl pík v retenčním čase kyseliny, a neposkytl žádný pík v retenčním čase laktonu. Vzorek simvastatinu neposkytl žádný pík v retenčním čase kyseliny, to znamená nepřítomnost kyseliny ve vzorku. Avšak vzorek poskytl měřitelný pík v retenčním čase simvastatinu (obr. 9C). Tento pík představuje přibližně 82% plochy píku

vzorku simvastatin kyseliny (obr. 10C). Pík je způsoben $A+1$ isotopem $[M+NH_4]^+$ iontu simvastatinu, který vzniká jako produkt m/z 303. Také hydrolýza laktonu by mohla způsobit pík v tomto retenčním čase laktonu. Nicméně výsledky z kanálu D ukazují, že hydrolýza neprobíhá. Kombinace výsledků obou vzorků ukazuje, že kanál C není selektivní pro kyselinu pokud neproběhne chromatografické rozdělení. Proto může být kanál použit pro přesné stanovení kyseliny v přítomnosti laktonu jen po předchozí separaci.

Kanál D, druhý kanál pro kyselinu či $[M+NH_4]^+$ kanál pro kyselinu. (m/z 454 \rightarrow 303).

Vzorek simvastatin kyseliny poskytl pík v retenčním čase kyseliny, a neposkytl žádný pík v retenčním čase simvastatinu (obr. 10D). Vzorek simvastatinu neposkytl pík v retenčním čase kyseliny (obr. 9D) ani v retenčním čase simvastatinu, to znamená, že hydrolýza neprobíhá. Kombinované výsledky obou vzorků naznačují, že kanál D je selektivní pro stanovení kyseliny v přítomnosti laktonu i bez předchozí separace sloučenin. Separace by byla vyžadována v případě hydrolýzy laktonu.

Mezi dvěma kanály, které lze použít pro stanovení laktonu, je více specifický $[M+H]^+$ kanál pro lakton. Chromatografická separace laktonu od kyseliny je potřebná, jestliže probíhá laktonizace, nezávisle na stupni rozlišení. Na druhé straně, $[M+NH_4]^+$ kanál pro lakton vyžaduje chromatografickou separaci při malém rozlišení i v případě, že laktonizace neprobíhá. Je to důsledek toho, že $[M+NH_4]^+$ laktonu je jen o jednotku nižší než $[M+H]^+$ kyseliny.

Mezi dvěma kanály, které lze použít pro stanovení kyseliny, je mnohem více specifický $[M+NH_4]^+$ kanál pro kyselinu. Chromatografická separace kyseliny od laktonu je potřebná, jestliže probíhá hydrolýza, nezávisle na stupni rozlišení. Na druhé straně, $[M+H]^+$ kanál pro kyselinu vyžaduje chromatografickou separaci nezávisle na stupni rozlišení a hydrolýze. Je to důsledek toho, že $[M+H]^+$ kyseliny je jen o jednotku vyšší než $[M+NH_4]^+$ laktonu.

Při práci s léčivými obsahujícími laktonový kruh či hydroxykyselinu, by měl analytik pamatovat na to, že mohou vznikat $[M+NH_4]^+$ ionty vedle $[M+H]^+$ iontů, i když mobilní fáze neobsahuje známý zdroj amonných iontů. Poměr $[M+NH_4]^+$ iontů k $[M+H]^+$ iontům nezávisí jen na mobilní fázi, ale také na volbě MS parametrů. Při vývoji metody stanovení laktonu, je třeba počítat s tím, že biologické vzorky obsahují odpovídající metabolit ve formě hydroxykyseliny. Opak platí při práci s hydroxykyselinami.

Závěr práce.

Q1 spektra laktonu a odpovídající hydroxykyseliny mohou obsahovat $[M+NH_4]^+$ ionty vedle $[M+H]^+$ iontů i v případě, že nejsou přítomny známé zdroje amonia. Potřeba chromatografické separace za účelem přesného stanovení množství laktonu nebo hydroxykyseliny v přítomnosti jejich metabolitů závisí na tom, zda probíhá laktonizace či hydrolýza, a dále na zvolených SRM kanálech a stupni rozlišení (8).

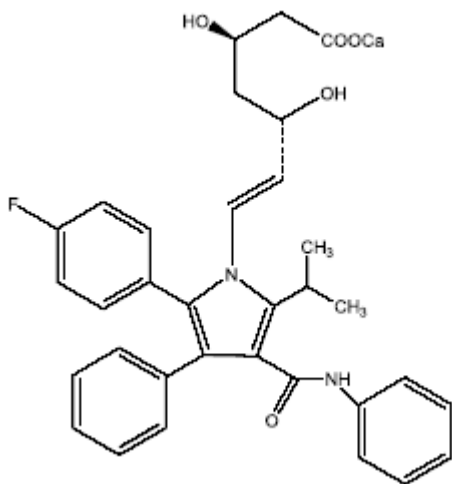
2.6 Jednotlivé metody stanovení statinů

V následující části jsou shrnuty metody stanovení statinů v biologických tekutinách sloužících ke zhodnocení jejich klinické účinnosti. Téměř všechny metody stanovení statinů jsou publikovány zvláště a jsou obvykle založené na technikách HPLC a GC. Byla také publikována metoda (4) umožňující současné stanovení tří statinů. Před nástřikem vzorku na kolonu jsou provedeny přečišťující kroky (LLE, SPE, a další), někdy také derivatizace statinů. Léčiva jsou detekována různými způsoby (UV, fluorimetrie, MS) (6).

Z přehledu je patrné, že většina metod umožňuje stanovení statinů v plasmě či séru řádově v koncentracích *ng/ml*, a tudíž jsou tyto postupy vhodné pro účely terapeutického monitorování léčiv. Stále však existuje objektivní potřeba vyvíjet nové, jednoduché a levné analytické metody stanovení statinů (6).

2.6.1 Atorvastatin

Kyselina (3R,5R)-7-[3-fenyl-4-(fenylkarbamoyl)-2-(4-fluorfenyl)-5-isopropylpyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanová, vápenatá sůl.



2.6.1.1 Klinická farmakokinetika

Atorvastatin je inhibitor HMG-CoA reduktázy, který účinně a v závislosti na dávce snižuje hladiny cholesterolu a triglyceridů. Také snižuje hladiny LDL a IDL. FDA schválila užívání atorvastatinu ke snížení rizika mozkové a srdeční příhody u pacientů s DM II bez příznaků srdečního onemocnění (10). Atorvastatin se podává ve formě vápenaté soli v dávkách 10-80 mg/den. Je velmi dobře rozpustný a kompletně se vstřebává po perorálním podání. Nicméně podléhá ve velké míře first-pass metabolismu ve střevní stěně a v játrech, a biodostupnost je 14%. Distribuční objem je 381 l a vazba na plasmatické proteiny přesahuje 98%. Atorvastatin je rozsáhle metabolizován ve střevě i v játrech oxidací, laktonizací a glukuronidací, metabolity jsou vylučovány biliární sekrecí a přímou sekrecí z krve do střeva. In vitro je atorvastatin substrátem p-glykoproteinu, organické anionty transportujícího polypeptidu (OATP) C a H⁺-kotransporteru monokarboxylových kyselin. Plasmatická clearance atorvastatinu je 625ml/min a eliminační poločas okolo 7 h. Renální cesta eliminace má minoritní význam (< 1%). Za tvorbu dvou aktivních metabolitů kyselé formy i laktonu atorvastatinu je zodpovědný CYP3A4. Atorvastatin a jeho metabolity jsou glukuronidovány uridindifosfoglukuronyltransferázami 1A1 a 1A3 (11).

Atorvastatin může být podáván ráno či večer. Jídlo mírně snižuje absorpci atorvastatinu po perorálním podání, ale neovlivňuje významně účinek. Atorvastatin je metabolizován CYP3A4 a transportován buněčnou membránou OAT proteinem typu C a p-glykoproteinem ze střeva. Výskyt lékových interakcí je ovlivněn inhibitory těchto systémů, především itrakonazolem (obecně azolovými antimykotiky), nelfinavirem, ritonavirem, cyklosporinem, fibráty, erythromycinem, clarithromycinem a grapefruitovou šťávou. Interakce s gemfibrozilem je zřejmě způsobena inhibicí glukuronidace a je nezávislá na CYP450 systému. Některé studie prokázaly rhabdomyolýzu v případě farmakokinetických interakcí atorvastatinu s jinými léčivými (k. fusidová, k. nikotinová). Atorvastatin zvyšuje biodostupnost digoxinu, pravděpodobně inhibicí p-glykoproteinu, ale neovlivňuje farmakokinetiku ritonaviru, nelfinaviru či terfenadinu (11).

2.6.1.2 Přehled analytických metod

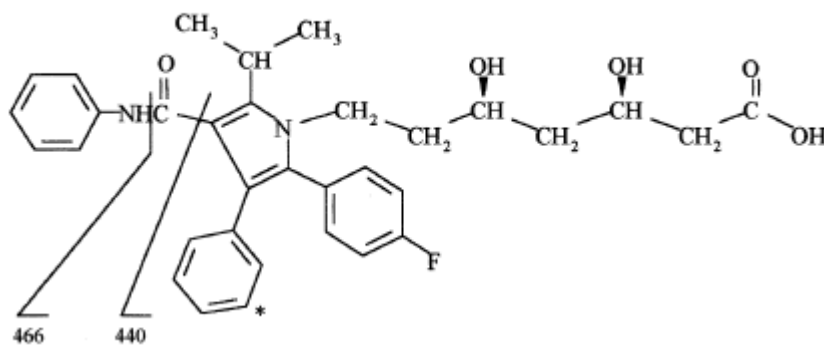
Atorvastatin podléhá rozsáhlému first-pass metabolismu, proto se v plasmě nachází ve velmi nízkých koncentracích (ng/ml). Metabolismem v játrech vznikají dva aktivní hydroxymetabolity, o- a p-hydroxyatorvastatin a tři odpovídající laktonové neaktivní formy. Okolo 70% celkové inhibiční aktivity v plasmě je přičítáno aktivním metabolitům. Plasmatické koncentrace aktivních metabolitů jsou velmi nízké (pg/ml). Stanovení atorvastatinu a metabolitů tedy vyžaduje velmi citlivou metodu. Plasmatické koncentrace parentní látky a metabolitů jsou předmětem zájmu farmakokinetických studií. Bioanalytická část farmakokinetické studie musí umožnit stanovení léčiva jednoduchým způsobem, s vysokou citlivostí, selektivitou, v malém objemu vzorku a v krátkém čase. Bylo již zveřejněno několik metod stanovení atorvastatinu v plasmě, a to enzymovou inhibicí: Cilla et al. (30); Gibson et al. (31); Shumm et al. (32); Siedlik et al. (33), radioimunoanalýzou: Posvar et al. (35); Radulovic et al. (34) a kapalinovou chromatografií s UV detekcí: Zarghi et al. (36). Imunoanalytické metody jsou atraktivní pro rutinní klinickou praxi díky snadnému provedení a citlivosti, nicméně postrádají specifickou a mohou poskytovat falešné výsledky v důsledku zkřížených reakcí. Chromatografické metody jsou upřednostněny pro svou citlivost a specifickou. Stanovení léčiv v biologickém materiálu kapalinovou chromatografií-tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) je stále běžnější díky vyšší citlivosti a selektivě této metody. Nejcitlivější je LC-MS/MS metoda (*Ramakrishna et al., Nirogi et al.*) (10) s limitem stanovení 100 pg/ml využívající komerčně dostupný vnitřní standard. *Bullen et al.* (12) zveřejnili a validovali LC-MS/MS metodu stanovení atorvastatinu a jeho aktivních metabolitů v lidské, psí a myší plasmě s použitím deuterovaných vnitřních standardů, které jsou však zřídka komerčně dostupné. LOQ všech analytů byl 250 pg/ml a celkový čas analýzy vzorku 6 min. Metoda zahrnuje zpětnou extrakci, která je zdlouhavá. *Jemal et al.* (13) zveřejnili LC-MS/MS metodu současného stanovení obou forem, kyselých a laktonových, atorvastatinu, orto- a para-hydroxyatorvastatinu v lidském séru rovněž s použitím deuterovaných vnitřních standardů. LOQ šesti analytů byl 500 pg/ml a celkový čas analýzy 3.5 min. Dále byla publikována LC-MS/MS metoda stanovení atorvastatinu a jeho metabolitů v lidské plasmě založená na extrakci na pevnou fázi (*Hermann et al.*) (14). LOQ byl 200 pg/ml pro atorvastatin a p-hydroxyatorvastatin a 500 pg/ml pro o-hydroxyatorvastatin. Celkový čas analýzy byl delší (21 min). V předchozích dvou zmíněných metodách byla použita gradientová eluce. *Koytchev et al.* (37) změřili plasmatické koncentrace atorvastatinu LC-MS/MS metodou s LOQ 400 pg/ml. Tři předchozí metody kromě Hermannovy metody byly použity v klinických studiích podávání atorvastatinu v dávkách 40 až 80 mg. Hermannova metoda byla použita v klinické studii po podání atorvastatinu v nejnižší registrované dávce 10 mg (10).

2.6.1.3 Metoda kapalinové chromatografie/ tandemové hmotnostní spektrometrie ke stanovení atorvastatinu (AT) a jeho aktivních metabolitů ortho-hydroxy (o-AT) a para- hydroxy (p-AT) atorvastatinu v lidské, psí a myší plasmě.

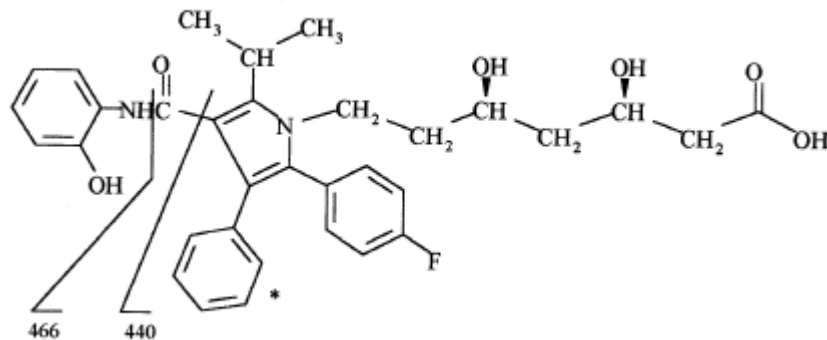
William W. Bullen et al. (12)

Metoda spočívá v promytí vzorků plasmy diethyletherem při vysokém pH a následné extrakci analytů a 2 vnitřních standardů [d5]-atorvastatinu ([d5]-AT) a [d5]-ortho-hydroxy atorvastatinu ([d5]-o-AT) diethyletherem z okyselené plasmy. Etherová vrstva byla odpařena do sucha, odparek rekonstituován octanem amonným (20mM, pH 4,0)-acetonitrilem-isopropanolem (60:40:1, v/v/v). Chromatografická separace byla provedena na koloně YMC J'Sphere H80 (C-18) 150×2 mm s částicemi o velikosti 4 μm, mobilní fázi tvořil acetonitril-0,1% octová kyselina (70:30, v/v). Analyty byly detekovány MS/MS. Metoda se prokázala jako vhodná pro rutinní stanovení AT, o-AT a p-AT v koncentracích 0,25-25 ng/ml. Přibližné retenční časy p-AT, o-AT, [d5]-o-AT, AT a [d5]-AT byly 2.27 ± 0.21 , 3.36 ± 0.23 , 3.54 ± 0.46 , 4.12 ± 0.61 , a 4.65 ± 0.65 min. Během validace nebyly pozorovány žádné interferující píky. Střední výtěžky AT, o-AT a p-AT se pohybovaly v rozmezí 100%–107%, 70.6%–104% a 47.6%–85.6%. Střední výtěžky vnitřních standardů [d5]-AT a [d5]-o-AT byly 98,0%-99,9% a 97,3%-97,9%. Nejnižší limit stanovení pro všechny analyty byl 0,25 ng/ml

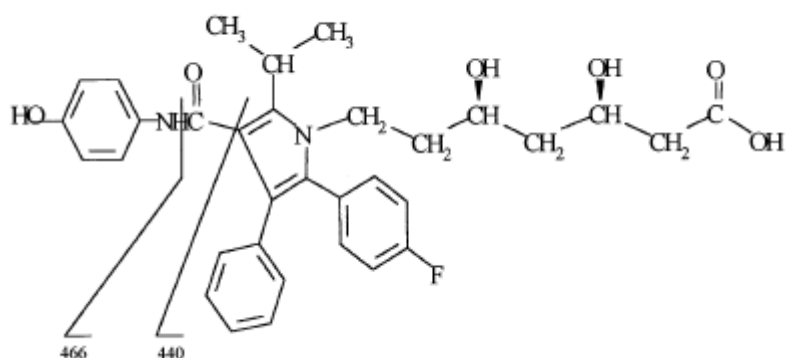
Strukturní vzorce AT, o-AT a p-AT jsou na obr. 11, 12 a 13. Deuterium u [d5]-AT a [d5]-o-AT analogů je lokalizováno na benzenovém jádru označeném hvězdičkou na obr. 11 a 12.



Obr. 11. Strukturní vzorec atorvastatinu (12).



Obr. 12. Strukturní vzorec ortho-hydroxyatorvastatin (12).



Obr. 13. *Strukturní vzorec para-hydroxyatorvastatinu (12).*

Kapalinová chromatografie-tandemová hmotnostní spektrometrie.

Chromatografický systém tvořila Series 200 LC pumpa a autosampler Perkin-Elmer. Detektor byl hmotnostní spektrometr Micromass Quattro II. Kolona YMC J'Sphere H 80 (C-18). Mobilní fázi tvořil acetonitril : 0,1% octová kyselina (70:30, v/v), byla nastavena malá rychlost toku 0,2 ml/min. Hmotnostní spektrometr pracoval v režimu MRM (multiple reaction monitoring). Vzorek byl ionizován elektrosprayem v pozitivním režimu. Ionty byly aktivovány kolizí (energie srážky 35 eV) při daném tlaku v atmosféře argonu ($2,0 \times 10^{-3}$ torr). K detekci všech analytů byl spektrometr nastaven na jedinou hmotnost a k výběru iontů $[M+H]^+$ při m/z 559,3 pro AT, 575,3 pro o-AT a p-AT, 564,3 pro [d5]-AT a 580,3 pro [d5]-o-AT (první quadrupol). Signály produkovaných iontů při m/z 440,2 a 445,2 analytů a vnitřních standardů byly monitorovány přes třetí quadrupol (hmotnostní filtr). MRM data byla získána a integrována pomocí MassLynx softwaru.

Extrakce vzorku.

Vzorky byly vytemperovány při 37 °C, promíchány a centrifugovány. Do zkumavek byl vložen 1ml plasmy, 0,2 ml vnitřního standardu a 0,5 ml 1N NaOH a obsah zhomogenizován v mixeru 60 s. Po přidání 5 ml diethyletheru byly zkumavky protřepávány v horizontální poloze 15 min. Roztoky byly vyčeřeny centrifugací. Spodní vodná vrstva byla zmrazena v lázni isopropanolu a suchého ledu, svrchní organická vrstva byla odstraněna. Vodná vrstva byla zahřáta na 37°C. Byly přidány 2,0 ml 1,0 N H_3PO_4 a vzorky znovu zhomogenizovány. Po přidání 10 ml diethyletheru byl obsah promíchán a centrifugován. Vodná vrstva byla zmrazena a etherová vrstva dekantována do konické baňky. Ether byl odpařen dusíkem při 40°C a odparek rekonstituován 0,2 ml octanu amonného (20mM, pH 4,0), acetonitrilu a isopropanolu (60:40:1), zhomogenizován a centrifugován.

Získání výsledků.

Metoda byla validována pro koncentrační rozmezí 0,250 až 25,0 ng/ml. U všech vzorků plasmy byl použit [d5]-AT jako vnitřní standard pro AT. U vzorků lidské a myší plasmy byl použit [d5]-o-AT jako vnitřní standard pro oba hydroxy-metabolity. U psí plasmy byl použit [d5]-AT jako vnitřní standard pro oba hydroxy-metabolity kvůli nedostupnosti [d5]-o-AT v čase analýzy.

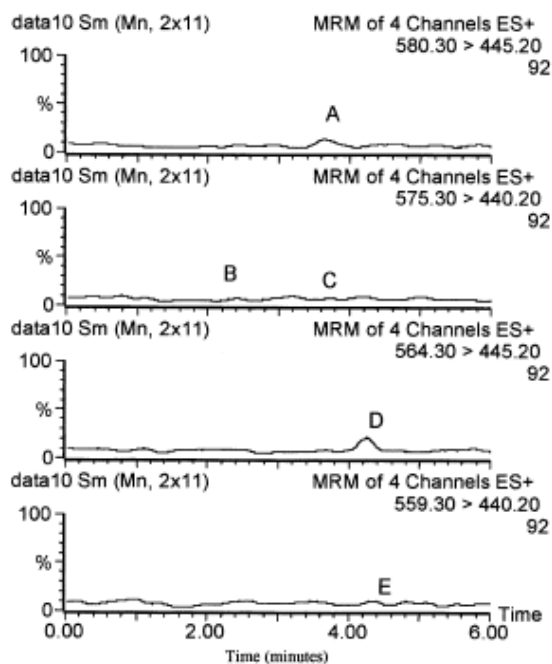
Tato metoda je robustní, citlivá a selektivní a lze použít pro současnou extrakci a stanovení AT, o-AT a p-AT při sledování farmakokinetiky těchto látek v klinických a preklinických studiích. Extrakce na pevnou fázi (SPE) využívající cyklohexan neposkytla reprodukovatelné výtěžky. LLE (liquid/liquid extraction) zahrnující zpětnou extrakci byla prokázána jako nejrobustnější metoda poskytující nejčistší vzorky. Zpětná extrakce může být výhodná, neboť snižuje riziko odstranění iontů a navíc poskytuje čistší vzorky. Vnitřní standardy rozpuštěné v plasmě místo ve vodě jsou výhodnější z hlediska reprodukovatelnosti plochy píku vnitřního standardu. Výtěžnost byla v posledním kroku optimalizována přidávkem octanového pufru (pH 4,0). Obsah 1% isopropanolu v rekonstituční směsi snížil míru adsorpce na sklo. Autoři analyzovali 150 vzorků v sérii bez zjevného ovlivnění citlivosti či přesnosti.

Selektivita metody.

Použitím rozkladných spekter byla zvýšena selektivita hmotnostní spektrometrie. Analyty mají karboxylovou skupinu, proto byly nejdříve detekovány negativní ionty jako prekurzory, detekce pomocí pozitivních iontů však zvyšuje citlivost metody. Rovněž byla provedena chemická ionizace (APCI), ale neposkytla žádné výhody. Fragmentační schéma analytů je naznačeno na obr. 11, 12 a 13.

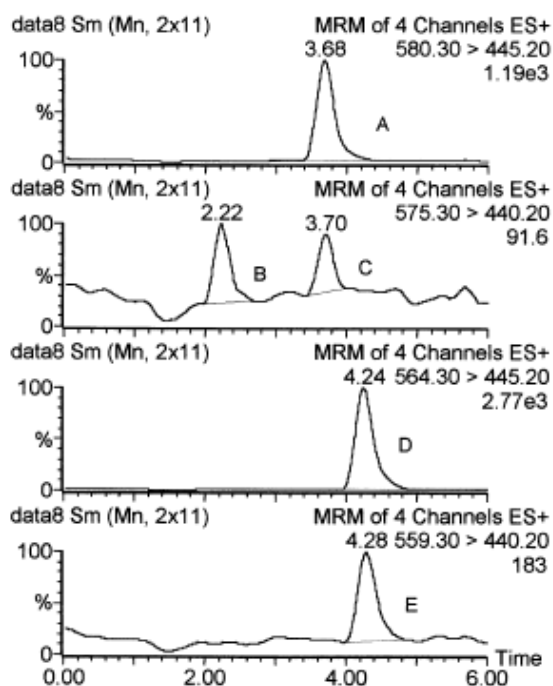
Selektivita chromatografické metody byla dokázána absencí interferujících píků v retenčních časech pro AT, o-AT, p-AT a [d5]-AT a [d5]-o-AT u blank plasmy nejméně z osmi zdrojů pro každý druh. Interference endogenního materiálu byla minimalizována způsobem přípravy vzorku a podmínkami HPLC a MS/MS. MRM iontové chromatogramy lidské blank plasmy jsou na obr.14.

Na obrázku 15 je chromatogram lidské plasmy obsahující standardní roztoky léčiva a metabolitů o koncentraci 0.25 ng/ml.



Obr. 14. MRM iontové chromatogramy lidské blank plasmy.

(A) [d5]-ortho-hydroxy atorvastatin, (B) para-hydroxy atorvastatin, (C) ortho-hydroxy atorvastatin, (D) [d5]-atorvastatin a (E) atorvastatin (12).



..

Obr. 15. MRM iontové chromatogramy lidské plasmy obsahující standardní roztoky o koncentraci 0.25 ng/ml.

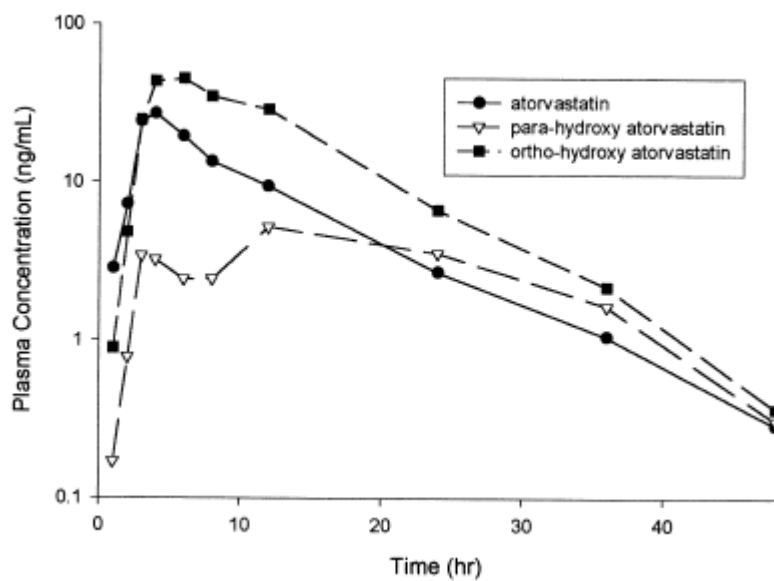
(A) [d5]-ortho-hydroxy atorvastatin, (B) para-hydroxy atorvastatin, (C) ortho-hydroxy atorvastatin, (D) [d5]-atorvastatin a (E) atorvastatin (12).

Validace, stejně jako analýza vzorků, byla provedena na stejné YMC koloně, pro více než 1000 nástřiků plasmy.

Aplikovatelnost metody.

Metoda byla použita ke stanovení plasmatických koncentrací AT, o-AT a p-AT pro farmakokinetickou analýzu při studiích biliární sekrece léčiva u lidí po jednorázovém perorálním podání 40 mg [¹⁴C]-AT (obr. 16). Metoda byla rovněž úspěšně aplikována v toxikokinetických studiích u zvířat.

Metoda je citlivá a selektivní, vhodná ke sledování farmakokinetiky statinů v klinických a preklinických stádiích. Limit stanovení u všech analytů je 0,250 ng/ml při dávkování 1,0 ml vzorku. Metoda je vhodná pro rutinní stanovení AT, o-AT a p-AT, v koncentracích 0,250-25,0 ng/ml (12).



Obr. 16. Závislost plasmatických koncentrací atorvastatinu a metabolitů na čase (12).

2.6.1.4 Stanovení kyselých forem atorvastatinu, jeho laktonu a biotransformačních produktů v lidském séru vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií/ tandemovou hmotnostní spektrometrií

Mohammed Jemal et al. (13)

Metoda slouží pro současné stanovení obou forem atorvastatinu, kyselých forem a laktonu, a rovněž obou forem jeho biotransformačních produktů, 2-hydroxyatorvastatinu a 4-hydroxyatorvastatinu v lidském séru (celkem 6 analytů). Jako vnitřní standard pro všechny analyty jsou použity deuteriem značené analogy. Kalibrační křivka byla zhotovena pro rozmezí koncentrací 0,5-200 ng/ml. Byly použity tři skupiny kontrolních vzorků (QC). První skupina obsahovala všech šest analytů ve stejné koncentraci, druhá pouze kyselých forem látky ve stejných koncentracích (tedy tři analyty) a třetí skupina pouze laktonové formy ve stejných koncentracích (tři analyty). Po přidání vnitřního standardu k 0,5 ml každého ze standardních i kontrolních vzorků uchovávaných při 4°C, byly vzorky okyseleny octanovým pufrům (pH 5,0) a extrahovány methyl-*terc*-butyletherem. Detekce byla provedena iontově pozitivní tandemovou hmotnostní spektrometrií využívající osm vybraných reakčních kanálů. Kyselých forem byly stabilní v lidském séru při pokojové teplotě, ale laktonové formy rychle hydrolyzovaly na jejich kyselých formy. Přeměna laktonových forem v obou QC skupinách a vzorcích lidského séra po podání dávky byla téměř kompletní po 24 h při pokojové teplotě. Stabilita laktonů v lidském séru byla zvýšena snížením pracovní teploty na 4°C a snížením pH séra na 6,0. Druhá a třetí kontrolní skupina obsahující pouze kyselých nebo laktonové formy potvrdila, že za těchto podmínek je stupeň hydrolyzy laktonové formy či laktonizace kyselých forem minimální (< 5%). Požadovaný nejnižší limit stanovení (LOQ) 0,5 ng/ml byl dosažen u všech analytů.

Oproti předchozí metodě lze touto metodou stanovit atorvastatin, odvozený lakton a jejich metabolity.

Extrakce vzorku.

Do všech zkumavek byl přidán pracovní roztok vnitřního standardu. Zkumavky byly zhomogenizovány. Ke každému vzorku bylo přidáno 0,5 ml octanového pufru (0,1 M, pH 5,0) o teplotě 4 °C. Vzorky byly znovu zhomogenizovány. Do každé zkumavky byl přidán methyl-*terc*-butylether, obsah byl intenzivně míchán 10 min a centrifugován. Zkumavky byly umístěny do ledové lázně za účelem zmrazení vodné vrstvy. Organická vrstva byla dekantována a odpařena, poté znovu rozpuštěna v rekonstitučním roztoku. Rekonstituční roztok byl připraven rozpuštěním 15,5 mg octanu amonného v 200 ml acetonitrilu a vody (40:60).

Chromatografické a spektrometrické podmínky.

Byla použita gradientová eluce kombinací mobilní fáze A (mobilní fáze A byla připravena smícháním 950 ml vody a 50 ml methanolu a 43 µl mravenčí kyseliny 88%) a B (mobilní fáze B byla připravena smícháním 950 ml acetonitrilu s 50 ml methanolu a 43 µl mravenčí kyseliny 88%) následujícím způsobem: 70% A a 30% B přechází na 45% A a 55% B mezi 0. a 1. minutou, tato fáze protéká 0,5 min. Poté se změní na původní složení mezi 1,5 a 1,6 min a protéká 1,9 min. Celkový čas je tedy 3,5 min. Teplota kolony byla udržována na 40 °C. Rychlost toku mobilní fáze 0,3 ml/min.

Hmotnostní spektrometr pracoval v pozitivním režimu. Vzorky byly analyzovány monitorováním vybraných produktů reakcí (SRM) využívajících přechodu $[M+H]^+$ iontu prekursoru na iont produktu pro každý analyt a vnitřní standard.

Výsledky.

U každé sloučeniny byl použit predominantní $[M+H]^+$ ion jako prekursor pro získání spekter produktu. U všech sloučenin byl hlavní produkt získán ztrátou fenylamino- nebo fenylaminokarbonyl- skupiny. Zdá se, že jeden způsob je častější u forem laktonu, zatímco druhý u forem s kyselou skupinou. V porovnání s ostatními inhibitory HMG-CoA reductázy, jako lovastatinem, simvastatinem a pravastatinem, se předpokládá snadnější vznik iontu $[M+H]^+$ (za stejných elučních a MS podmínek) vzhledem k obsahu dvou dusíkových atomů. Proto není nutné použít negativní režim využívající $[M+H]$ jako prekursor pro AT a jeho dva kyselé metabolity. Při použití negativního režimu pro stanovení kyselých sloučenin je nutné změnit polaritu v průběhu analýzy, aby bylo možné detekovat i laktonové formy. Změna polaritě během analýzy vyžaduje sjednocení elučních časů kyselých forem a jejich oddělení od elučních časů laktonových forem. To nemusí být snadno dosažitelné vzhledem k tomu, že laktonová forma jedné sloučeniny se může eluovat blízko kyselé formy jiné sloučeniny. Proto byl použit pozitivní režim pro obě formy sloučenin.

Účinnost extrakce analytů ze séra byla hodnocena ve třech koncentracích a pohybovala se v rozmezí 60 až 100%. Extrakce 4-hydroxy AT byla méně účinná než 2-hydroxy AT, což lze očekávat vzhledem k větší polaritě 4-hydroxy AT. Polarita 2-hydroxy AT je snížena v důsledku intramolekulárních vodíkových můstků s $-NH-$ skupinou v ortho pozici, což není možné u 4-hydroxy sloučeniny. Retenční čas 4-hydroxy sloučeniny je ve shodě s rozdílem polaritě. Je zajímavé, že u všech kyselých sloučenin byla získána poměrně vysoká extrakční účinnost, přestože se předpokládá, že karboxylová skupina každé sloučeniny je ionizována z více než 50% při pH séra 6,0 u vzorků použitých k analýze. pK_a atorvastatinu je 4,5. Hodnoty koeficientů variability a správnosti byly u všech analytů a QC vzorků v rozmezí 15%.

Specifičnost metody byla prokázána absencí endogenních látek v lidském séru interferujících se stanovením analytů v nejnižším limitu kvantifikace (LOQ). Pro ověření LOQ bylo do šesti vzorků blank séra (různí dárci) přidáno limitní množství analytu (0,5 ng/ml) a po přidání vnitřního standardu byly vzorky analyzovány oproti kalibrační křivce. Rovněž bylo analyzováno šest vzorků séra bez analytu pouze s vnitřním standardem (QC0), za účelem zjištění, jestli některé endogenní součásti plasmy jsou koeluovány společně s analyty. Přesnost a správnost u LOQ koncentrací byla $< 20\%$. Srovnáním chromatogramů QC0 a LOQ vzorků byla prokázána specifičnost metody, detekované odpovědi a retenční časy byly významně nižší u QC0.

Byly také zkoumány stabilitní profily všech analytů v séru při pokojové teplotě. Laktonové formy ve všech QC vzorcích podléhaly hydrolyze. U vzorků byla hydrolyza kompletní do 24 h. Naproti tomu, kyselé formy byly zcela stabilní. Zkouška byla opakována při 4 °C a podařilo se snížit stupeň hydrolyzy laktonových forem na méně než 40% za 24 h. Dále byla studována stabilita v pufrovaném séru. Hydrolyza tak byla snížena na méně než 12% při pokojové teplotě a méně než 3% při 4 °C za 24 h. Stabilizace laktonů snížením pH na 6,0 byla v souladu s publikovanou prací o vlivu pH na vzájemnou konverzi mezi kyselou a laktonovou formou atorvastatinu (Kearney, Crawford et al., *Pharm. Res.* **10**, p.1461, 1993). Nebyl nalezen významný rozdíl ve stupni hydrolyzy při úpravě pH na 4-6. Ze stejného důvodu snížení stupně hydrolyzy bylo upraveno pH rekonstitučního roztoku na pH 5,0. Rovněž byla sledována stabilita vzorků plasmy obsahující AT při pokojové teplotě a při 4 °C. Stabilitní chování bylo podobné jako u QC vzorků. Je třeba zmínit, že nestabilita laktonů ve

vodném mediu bez pufru není způsobena jen hydrolýzou, ale také tvorbou esterů v reakci s alkoholy, např. methanolem. Proto nebyl methanol při přípravě zásobních roztoků použit.

Metoda je citlivá, specifická, přesná a reprodukovatelná a lze použít pro současné stanovení kyselých a laktonových forem AT a jeho 2 biotransformačních produktů v lidském séru. Podmínky pro zacházení se vzorkem a extrakci byly zvoleny tak, aby minimalizovaly vzájemnou přeměnu kyselé a laktonové formy analytů. Metoda s *limitem detekce 0,5 ng/ml* byla úspěšně použita k analýze vzorků lidského séra (13).

2.6.1.5 Současné stanovení atorvastatinu a jeho aktivních metabolitů v lidské plasmě kapalinovou chromatografií-tandemovou hmotnostní spektrometrií s použitím rosuvastatinu jako vnitřního standardu

Ramakrishna V.S. Nirogi et al. (10)

Tato jednoduchá, citlivá, selektivní a rychlá metoda LC-MS/MS byla validována pro stanovení atorvastatinu a jeho aktivních metabolitů *o*- a *p*-hydroxyatorvastatinu v lidské plasmě. Po jednoduché LLE extrakci byly analyty rozděleny pomocí isokratické eluce na obrácených fázích C₁₈ kolony a detekovány hmotnostně spektrometricky v MRM (multiple reaction monitoring) nastavení s použitím [M+H]⁺ iontů; hodnoty byly *m/z* 559/440 pro atorvastatin, *m/z* 575/466 pro *o*-hydroxyatorvastatin a *m/z* 575/440 pro *p*-hydroxyatorvastatin, *m/z* 482/258 pro vnitřní standard (IS). Tato metoda používá komerčně dostupný vnitřní standard, rosuvastatin. Umožňuje stanovit atorvastatin a jeho metabolity v koncentraci do 100 pg/ml. Nejnižší limit kvantifikace 100 pg/ml byl stanoven s relativní odchylkou menší než 8%. Průměrná výtěžnost atorvastatinu, *o*-hydroxyatorvastatinu, *p*-hydroxyatorvastatinu a IS dosahovala hodnot 54.2 ± 3.2, 50.1 ± 3.8, 65.2 ± 3.6 a 71.7 ± 2.7%. Doba analýzy jednoho vzorku 2.5 min umožnila analyzovat více než 300 vzorků plasmy denně. Validovaná metoda byla aplikována v analýze vzorků plasmy ve studiích farmakokinetických, bioekvivalenčních a studiích biodostupnosti.

LC-MS/MS vybavení a podmínky.

Agilent 1100 Series HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) zařízení je vybaveno G1312A binární pumpou, G1379A degasserem, G1367A autosamplerem s G1330B thermostatem, G1316A thermostatovanou kolonou a G1323B kontrolním modulem. Chromatografická separace byla provedena na Waters symmetry® C18 koloně (5.0 μm, 100 × 4.6 mm i.d.) při 30°C. Isokratická mobilní fáze obsahující 0.03% kyselinu mravenčí v acetonitrilu (30:70, v/v), měla průtokovou rychlost 1.0 ml/min. Spektrometrická detekce byla provedena na API 4000 spektrometru s trojitým kvadrupolem (ABI-SCIEX, Toronto, Kanada).

Příprava vzorku.

Vzorek plasmy byl přenesen do skleněné zkumavky, byl přidán pracovní roztok IS (1 μg/ml) a 10% *ortho*-fosforečná kyselina. Po homogenizaci vzorku byla přidána extrakční směs diethyletheru-dichlormethanu (7:3, v/v), a vzorek byl znovu zhomogenizován. Organická vrstva byla přenesena do zkumavky a odpařena při 40°C v atmosféře dusíku. Odparek byl rekonstituován v 250 μl mobilní fáze a 10 μl alikvotní podíly byly nastříkány na kolonu.

Za účelem získání požadovaného LOQ (100 pg/ml) bylo nutné použít MS/MS detekci, kterou je dosažen nižší limit detekce při analýze směsi stopových látek. Rovněž předpokládaná selektivita MS/MS detekce přispívá k vývoji selektivní a citlivé metody. [M+H]⁺ byl převládajícím iontem Q1 spektra a byl použit jako prekurzor. Přestože analyty mají v molekule karboxylovou část, detekce negativních iontů byla méně citlivá než pozitivních iontů. Ve srovnání s jinými statiny jako lovastatin, simvastatin a pravastatin, očekávaná tvorba [M+H]⁺ iontů je snazší u atorvastatinu, neboť obsahuje dva dusíkové atomy (Jemal *et al.*, 1999). Nejcitlivější hmotnostní přechody byly od *m/z* 559 do 440 pro

atorvastatin, od m/z 575 do 466 pro ortho-hydroxyatorvastatin, od m/z 575 do 440 pro para-hydroxyatorvastatin a od m/z 482 do 258 pro IS. Převládající produkt atorvastatinu a para-hydroxyatorvastatinu (m/z 440) je tvořen ztrátou neutrální fenylaminokarbonylové skupiny zatímco u ortho-hydroxyatorvastatinu hlavní produkt (m/z 466) vzniká ztrátou neutrální fenylaminové skupiny. To může být způsobeno intramolekulárními vodíkovými můstky s NH skupinou v ortho pozici. Tento produkt (m/z 466) byl specifický pro ortho-hydroxyatorvastatin a byl považován za nejvhodnější pro detekci z hlediska specifčnosti a citlivosti metody.

Výběr mobilní fáze.

Chromatografické podmínky, zvláště složení mobilní fáze, byly optimalizovány za účelem zajištění dobrého rozlišení a symetrického tvaru píků všech analytů a IS, stejně jako pro dosažení krátké doby analýzy vzorku. Bylo zjištěno, že směs 0.03% kyseliny mravenčí a acetonitrilu (30:70, v/v) splňuje tyto požadavky, a proto byla použita jako mobilní fáze. Kyselina mravenčí snižuje pH za současné protonace analytů, a tím je získán vhodný tvar píku. Procento kyseliny bylo zvoleno tak, aby byl udržen tvar píku a zároveň bylo dosaženo optimální ionizace a fragmentace v MS. Při vysokém podílu organické fáze byly analyty eluovány v pořadí p-, o-hydroxyatorvastatin a atorvastatin (1.1, 1.6 a 1.8 min), a vnitřní standard v 1.3 min. Retenční čas p-hydroxyatorvastatinu byl krátký v důsledku nejvyšší polarita. Polarita o-hydroxyatorvastatinu je snižována intramolekulárními vodíkovými můstky, které nejsou přítomny u p- hydroxyatorvastatinu (Jemal *et al.*, 1999). Průtoková rychlost 1 ml/min zajistila dobrý tvar píků a umožnila dosáhnout celkový čas analýzy 2.5 min.

Vnitřní standard.

V LC-MS/MS analýze je použití deuterovaných analogů léčiva jako vnitřních standardů prokazatelně užitečné, jestliže se vyskytuje ve významné míře matrix efekt. Nicméně isotopem značené látky nejsou komerčně dostupné a náklady na jejich syntézu zabraňují jejich používání. Proto byl v této studii vybrán rosuvastatin. Byly získány zřetelné chromatogramy a nebyly pozorovány žádné přímé interference v MRM kanálech v relevantních retenčních časech. Nicméně při ESI se může vyskytnout potlačení či zvýšení signálu následkem přítomnosti současně eluovaných endogenních složek matrix vzorku. Tento možný matrix efekt byl hodnocen při nástřiku plasmy (po LLE extrakci) obsahující nízkou a vysokou koncentraci analytu. Výsledky byly porovnány s hodnotami získanými po nástřiku standardních roztoků bez plasmy obsahujících stejnou koncentraci analytů. Výsledky nepotvrdily významné rozdíly mezi vzorky plasmy a čistými standardními roztoky. To pravděpodobně odráží účinnost procesu LLE extrakce. V každém případě použití kalibrační křivky minimalizuje tyto efekty.

Selektivita.

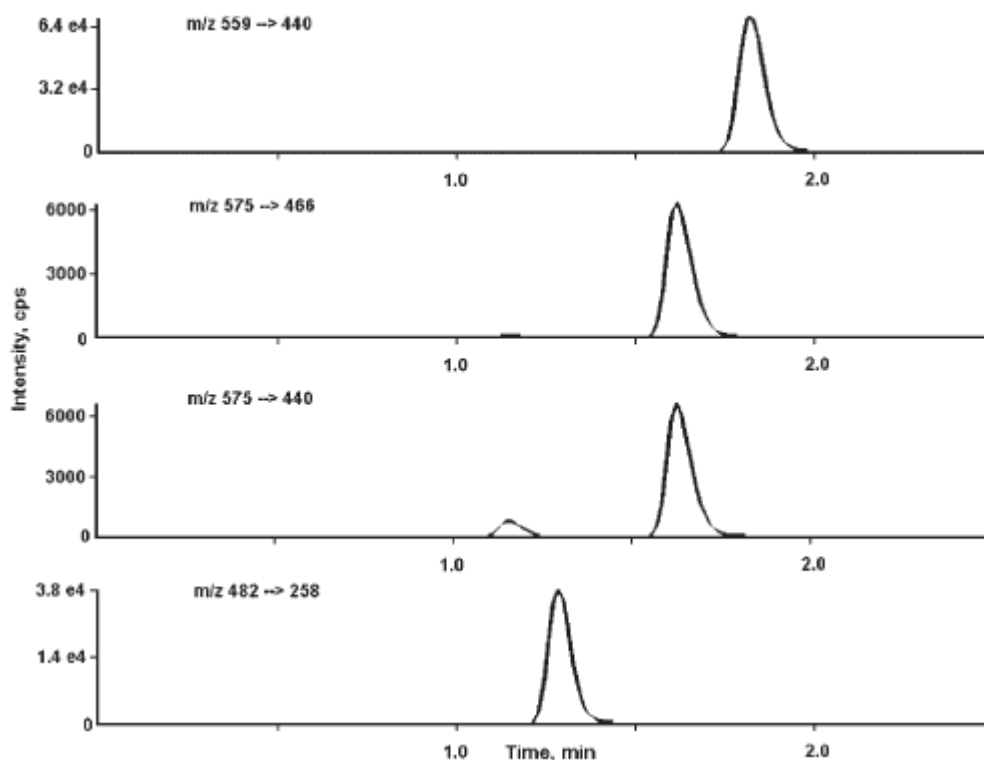
Nebyly pozorovány žádné přímé interference v retenčních časech analytů. Podobně nebyly přítomné žádné interference pocházející z vnitřního standardu v MRM kanálech analytů. MRM chromatogramy získané z extrahovaných vzorků plasmy subjektu účastnícího se bioekvivalenční studie vedené se 24 zdravými dobrovolníky jsou znázorněny na obrázku 17.

Extrakční účinnost.

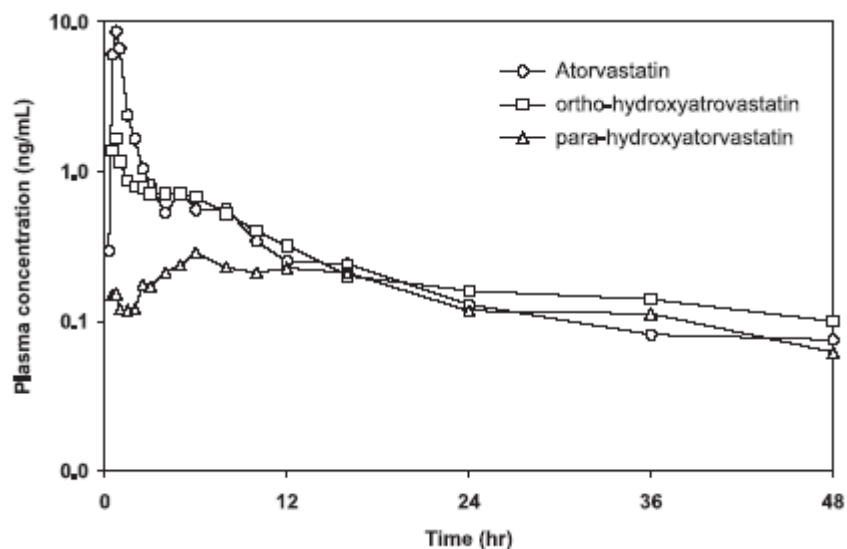
Při přípravě vzorku byla použita LLE extrakce. LLE je účinná při produkci spektroskopicky čistých vzorků a zamezí přivedení netěkavých látek na kolonu a MS systém. Čisté vzorky jsou nezbytné pro snížení suprese iontů a matrix efektu v LC-MS/MS analýze. Za optimální byla považována směs diethyletheru a dichlormethanu (7:3, v/v). Vzorky plasmy byly smíchány s orthofosforečnou kyselinou (10%), aby byly analyty před extrakcí v neionizované formě. Průměrná výtěžnost atorvastatinu, o- a p-hydroxyatorvastatinu z plasmy měla hodnoty 54.2 ± 3.2 , 50.1 ± 3.8 a $65.2 \pm 3.6\%$, výtěžnost IS byla $71.7 \pm 2.7\%$ pro koncentraci použitou při analýze (1 $\mu\text{g/ml}$).

Aplikace metody.

Validovaná metoda byla použita ke stanovení atorvastatinu, o- a p-hydroxyatorvastatinu ve vzorcích lidské plasmy po perorálním podání jednotlivé dávky 10 mg atorvastatinu. Reprezentativní plasmatické profily u subjektu po podání jednotlivé dávky jsou na obrázku 18.



Obr. 17. MRM chromatogramy plasmy dobrovolníka po podání 10 mg atorvastatinu. Koncentrace atorvastatinu, o- a p-hydroxyatorvastatinu byly stanoveny na 6.6, 1.1 a 0.2 ng/ml (10).



Obr. 18. Plasmatický profil zdravého dobrovolníka po podání 10 mg atorvastatinu (10).

Tato metoda přináší významné výhody oproti dříve publikovaným metodám co se týče citlivosti, selektivity, kratší doby analýzy (2.5 min) a rychlé extrakce. Po desetinásobném zředění bylo zjištěno, že horní limit kvantifikace lze zvýšit na 80 ng/ml. Proto je metoda vhodná pro studie po jednorázovém i opakovaném podání se zvýšenými hladinami léčiva. Současná metoda je dostatečně přesná a citlivá pro stanovení atorvastatinu, o- a p-hydroxyatorvastatinu v lidské plasmě ve farmakokinetických, bioekvivalenčních studiích a studiích biodostupnosti. Požadovaná citlivost stanovení atorvastatinu, o- a p-hydroxyatorvastatinu byla dosažena hodnotou *LOQ* 100 pg/ml. Jednoduchost metody používající extrakci do kapaliny s komerčně dostupným IS a rychlostí 2.5 min/1 vzorek ji činí atraktivní pro rutinní analýzu. Validovaná metoda umožňuje stanovení atorvastatinu, o- a p-hydroxyatorvastatinu v koncentračním rozmezí 0.1–20 ng/ml (10).

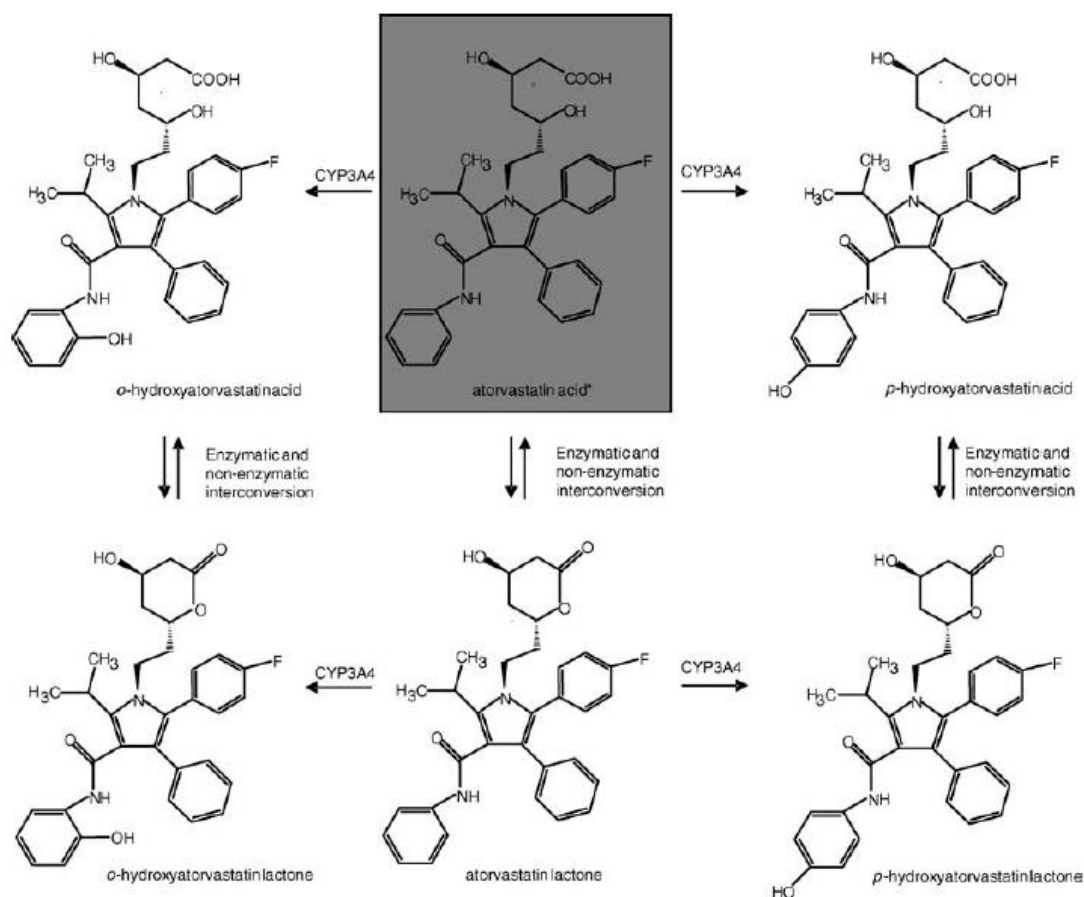
2.6.1.6 Stanovení atorvastatinu a jeho metabolitů v lidské plasmě po extrakci na pevnou fázi metodou LC–MS

M. Hermann, H. Christensen, J. L. E. Reubsaet (14)

Cílem této studie bylo vyvinout chromatografickou metodu stanovení atorvastatinu, o- a p-hydroxyatorvastatinu (kyselé a laktonové formy) v lidské plasmě po podání atorvastatinu v nejnižší registrované dávce (10 mg). Vzorky byly extrahovány na pevnou fázi a analyty separovány mobilní fází s lineárním gradientem o složení acetonitril, voda a mravenčí kyselina. Detekce byla uskutečněna tandemovou hmotnostní spektrometrií pozitivních iontů. Validace metody s dostupnými referenčními sloučeninami (kyselé formy atorvastatinu, o- a p-hydroxyatorvastatinu) prokázala linearitu v koncentračním rozmezí 0.2–30 ng/ml pro atorvastatin kyselinu a p-hydroxyatorvastatin kyselinu, a 0.5–30 ng/ml pro o-hydroxyatorvastatin kyselinu ($r^2 \geq 0.99$, $n=5$ pro všechny analyty). Hodnoty správnosti a přesnosti (hodnocená pro koncentrace atorvastatinu a p-hydroxyatorvastatinu 0.5, 3 a 30 ng/ml a o-hydroxyatorvastatinu 1, 3 a 30 ng/ml) byly uspokojivé. Detekční limit atorvastatinu a p-hydroxyatorvastatinu byl 0.06 ng/ml a o-hydroxyatorvastatinu 0.15 ng/ml. Metoda byla použita v klinické studii, kde atorvastatin, o- a p-hydroxyatorvastatin (kyselé i laktonové formy) byly detekovatelné ve 24 h dávkovacím intervalu při podávání dávky 10 mg atorvastatinu po dobu 1 týdne.

Atorvastatin je podáván jako vápenatá sůl aktivní kyselé formy a podstupuje konverzi na neaktivní formu laktonu *in vivo*. Je metabolizován CYP3A4 na dva hydroxylované metabolity o-hydroxyatorvastatin a p-hydroxyatorvastatin, které se v organismu nacházejí také v obou formách (kyselé a laktonové). Asi 70% celkové inhibiční aktivity v plasmě je přičítáno aktivním metabolitům.

Přestože jsou laktonové formy neaktivní z hlediska snižování hladiny lipidů, není jasné, zda přispívají k vedlejším účinkům statinů. Proto jsou nutné specifické chromatografické metody stanovení parentní látky, laktonu, aktivních i neaktivních metabolitů. Cílem této studie tedy bylo vyvinout chromatografickou metodu stanovení kyselých forem atorvastatinu, o- a p-hydroxyatorvastatinu a jejich laktonů v lidské plasmě po podání nízké dávky atorvastatinu (10mg), s přípravou vzorku extrakcí na pevnou fázi.



Obr. 19. Chemická struktura atorvastatinu (v podávané formě), jeho hydroxylovaných metabolitů o- a p-hydroxyatorvastatinu a produktů konverze atorvastatinu laktonu, o- a p-hydroxyatorvastatin laktonů (14).

Instrumentace.

HPLC vybavení zahrnovalo Spectra System P4000 kvarterní pumpu. K detekci byl použit Finnigan LCQDUO ion trap MS detektor v pozitivním režimu.

Příprava vzorku.

Příprava vzorků od zdravých dobrovolníků a vzorků plasmy obsahujících alikvotní podíly analytů byla provedena extrakcí na pevnou fázi, za uchování vzorků v ledové lázni během přípravy. K 1 ml plasmy bylo přidáno 10 ng vnitřního standardu (metachalon) a po homogenizaci a centrifugaci 1 ml mravenčanu sodného (pH 3; 1 M). Supernatant byl přenesen na 3 ml C₁₈ (100 mg) SPE cartridge (Varian, Harbor City, CA, USA) promyt 1 ml acetonitrilu a 2 ml vody. Cartridge byl promyt 1 ml vody a 1 ml směsi methanolu-vody (30:70, v/v), analyty byly eluovány 750 μl acetonitrilu-octanu amonného (0.1 M; 95:5, v/v). Vzorek byl odpařen do sucha v atmosféře dusíku a odparek rekonstituován ve 120 μl mobilní fáze A (viz dále) a před nástřikem na kolonu centrifugován.

Chromatografické podmínky.

Pro chromatografickou separaci složek byla použita analytická kolona Omnisphere C₁₈ (3 μm, 30×2 mm) s předkolonou Chromguard (5 μm, 10×2 mm), obě (Varian, Harbor City, CA, USA). Analyty byly eluovány gradientovou elucí mobilní fází A (acetonitril-mravenčí kyselina 1mM, 30:70, v/v) a mobilní fází B (acetonitril-mravenčí kyselina 1mM, 60:40, v/v). Během prvních 5 min bylo složení mobilní fáze lineárně měněno ze 100% mobilní fáze A na 60% A a 40% B, toto složení bylo udržováno 11 min a vráceno zpět na 100% A během 1 min před ustálením toku mobilní fáze A po 4 min. Průtoková rychlost během prvních 17 min byla 0.2 ml/min a 0.4 ml/min během ustalování po 4 min. Teplota autosampleru byla nastavena na 4°C.

Spektrometrické podmínky.

Hmotnostní spektrometr byl nastaven v pozitivním režimu a spojen s chromatografickým systémem s použitím API electrospray interface. Nastavení detektoru pro optimální operační podmínky a zároveň a optimální energii disociace bylo dosaženo dodáváním atorvastatinu, o- a p-hydroxyatorvastatinu a laktonů přes T-konektor. Za účelem získání maximální citlivosti bylo použito 7 segmentů. MS detektor pracoval v SRM režimu (single reaction monitoring) v každém ze sedmi segmentů.

Výsledky. Příprava vzorku, chromatografie a MS detekce.

V této studii byla vyvinuta extrakce na pevnou fázi při přípravě vzorků lidské plasmy před LC-MS stanovením. Vzorky plasmy byly smíchány s pufrem (mravenčan sodný, pH 3; 1 M) za účelem získání neionizované formy před vložením do SPE cartridge. Promývání roztoky obsahujícími více než 20% acetonitrilu nebo 30% methanolu ve vodě způsobilo dramatický pokles ve výtěžnosti metabolitů. Promývání 30% methanolem ve vodě poskytlo čistší vzorky a menší variabilitu hodnot výtěžnosti než promývání 20% roztokem acetonitrilu, bylo tedy preferováno. Pro eluci analytů byl použit acetonitril-octan amonný (0.1 M; 95:5, v/v). Objem 750 μl byl potřebný k dosažení maximální výtěžnosti. Dobrá separace složek byla nutná k umožnění použití SRM, s následným snížením limitu detekce. Celkový čas analýzy v chromatografickém systému byl tedy 21 min se zahrnutím času potřebného k ustálení toku mobilní fáze. Retenční časy atorvastatinu a metabolitů byly mezi 6.2 a 15.6 min a retenční čas pro vnitřní standard byl 3.9 min. Identifikace atorvastatinu a metabolitů v obou formách byla uskutečněna nástřikem referenčních látek a následným srovnáním.

Interkonverze.

Atorvastatin a metabolity podléhají vzájemné přeměně mezi kyselou formou a laktonem nejen in vivo, ale také po odběru vzorku (během skladování, přípravy vzorku, analýzy a detekce (in-source interkonverze) ex vivo. Před validací analytických metod týkajících se sloučenin náchylných ke konverzi, které se vyskytují v obou formách in vivo, lze jejich relativní koncentrace napodobit v kontrolních vzorcích podle očekávaných koncentrací v biologickém materiálu. Ale jak upozornili Jemal a Xia tyto koncentrace mohou být neznámé a mohou se lišit v každém vzorku. To bylo jasně demonstrováno v uskutečněné studii s podáváním 10 mg atorvastatinu 18 zdravým dobrovolníkům, kde se poměr atorvastatinu a jeho laktonu lišil až 175 krát mezi pacienty 24 h po podání. Poměr se lišil až 7krát u jednoho pacienta během 24 h intervalu pro atorvastatin a asi 20 krát pro o- a p-hydroxyatorvastatin. Nedostupnost referenčních látek se známou koncentrací laktonů zamezilo přidávek obou

forem (kyselé a laktonové) sloučenin, který by napodobil koncentrace in vivo. Vzhledem k variabilitě jejich poměrů mezi pacienty i v čase měla rozhodující roli minimalizace jejich vzájemné přeměny při přípravě vzorku a stanovení. Tato studie prokázala, že uchovávání vzorků v ledové lázni či maximálně při 4°C po celou dobu zacházení se vzorkem je účinným způsobem, pokud nejsou k dispozici referenční látky pro konvertující sloučeniny. Tento závěr je v souladu s předchozí metodou stanovení pravastatinu (Jemal M., Xia YQ).

Přestože jsou vzorky uchovávány při nízké teplotě, in-source konverze zůstává problémem vyžadujícím chromatografickou separaci konvertujících látek, aby byl definován stupeň konverze vyskytující se před nebo během MS detekce. In-source konverze byla testována metodou MS a nebyla detekována žádná přeměna kyselé formy na laktonovou. Malé, ale stále množství laktonu bylo in-source konvertováno na kyselou formu.

Aplikace metody.

Metoda byla vyvinuta pro farmakokinetické studie atorvastatinu a metabolitů v lidské plasmě po podání nejnižší registrované dávky atorvastatinu (10 mg). Metoda byla použita ve studii zkoumající farmakokinetické interakce mezi atorvastatinem a cyklosporinem u pacientů po transplantaci ledvin. Po podání 10 mg atorvastatinu byly monitorovány hladiny atorvastatinu, o- a p-hydroxy atorvastatinu v obou formách u 18 zdravých dobrovolníků. Kromě kyselých forem byly určovány i laktonové formy u všech pacientů. Jejich přítomnost byla potvrzena srovnáním retenčních časů MS/MS spekter se syntetizovanými laktony. Vzhledem k absenci referenčních látek byly křivky plasmatické koncentrace versus čas pro všechny laktony získány na základě arbitrárních jednotek (jinými slovy MS/MS signál laktonu ve vztahu k MS/MS signálu vnitřního standardu na mililitr plasmy). Toto arbitrární stanovení umožňuje získat parametry jako poločas, čas dosažení maximální plasmatické koncentrace a poskytuje pseudo-hodnoty maximální a minimální plasmatické koncentrace stejně jako plochu pod křivkou plasmatické koncentrace vs. čas. Tyto údaje jsou užitečné pro relativní srovnávání, ale je nutné si uvědomit, že farmakokinetické parametry odvozené z těchto arbitrárních jednotek jsou nejisté, neboť linearita odpovědi, správnost a přesnost nebyly hodnoceny. Tento přístup byl již dříve úspěšně aplikován u jiných sloučenin, pro které nebyly referenční látky k dispozici.

Závěr.

V této práci byla provedena SPE extrakce vzorku oproti předchozím studiím používajícím LLE extrakci, s následnou HPLC analýzou a MS detekcí. Validované výsledky pro atorvastatin, o- a p-hydroxyatorvastatin v kyselé formě byly uspokojivé. Vzhledem k nedostupnosti referenčních látek nebyla umožněna validace výsledků laktonových forem těchto látek. Metoda byla aplikována v klinické studii, kde atorvastatin, o- a p-hydroxyatorvastatin (obě formy) byly detekovatelné ve 24 h dávkovacím intervalu v ustáleném stavu při podávání 10 mg atorvastatinu zdravým dobrovolníkům (14).

2.6.1.7 Stanovení atorvastatinu v lidském séru kapalinovou chromatografií na obrácených fázích s UV detekcí

Gholamreza Bahrami et al. (15)

Tato HPLC metoda stanovení atorvastatinu v lidském séru je rychlá a zároveň dostatečně citlivá. Po LLE extrakci léčiva a vnitřního standardu (diklofenak sodná sůl) byla uskutečněna chromatografická separace na C₁₈ analytické koloně mobilní fází tvořenou fosforečnanovým pufrům (0.05 M, pH 4.0) a methanolem (33:67, v/v). Atorvastatin a vnitřní standard byly detekovány při vlnové délce 247 nm. Průměrné výtěžky léčiva a vnitřního standardu byly 95% a 80%. Limit detekce byl 1 ng/ml a limit kvantifikace 4 ng/ml; kalibrační křivka byla lineární v rozmezí koncentrací 4–256 ng/ml atorvastatinu v séru. Metoda byla aplikovaná v randomizované bioekvivalenční studii dvou přípravků obsahujících atorvastatin u 12 zdravých dobrovolníků.

Příprava standardních roztoků.

Zásobní roztoky atorvastatinu (AT) a vnitřního standardu (IS) byly připraveny rozpuštěním sloučenin v methanolu. Pracovní roztoky AT byly připraveny ředěním methanolem. Fosfátový pufr (0.1 M) byl upraven na pH 7.0 s 0.1 M *o*-fosforečnou kyselinou. Roztoky byly uchovávány při 4°C a byly stabilní nejméně po 4 týdny.

Chromatografické podmínky.

HPLC systém obsahoval dvě čerpadla (LC-10AD), thermostat (CTO-10A), UV-VIS spektrofotometrický detektor (SPD-10AD) pracující při vlnové délce 247 nm, degasser (DGU-3A) a data procesor (C-R4A) vše od Shimadzu, Kyoto, Japonsko. Chromatografická separace byla provedena s použitím Shim-pack CLC-ODS analytické kolony (150 mm × 4.6 mm I.D.), 5 μm, a Shim-pack G-ODS předkolony (1 cm × 4.0 mm I.D., 5 μm) s použitím mobilní fáze složené z 0.05 M fosfátového pufru-methanolu (33/67, v/v) upravené na pH 4.0 kyselinou *o*-fosforečnou.

Příprava vzorku.

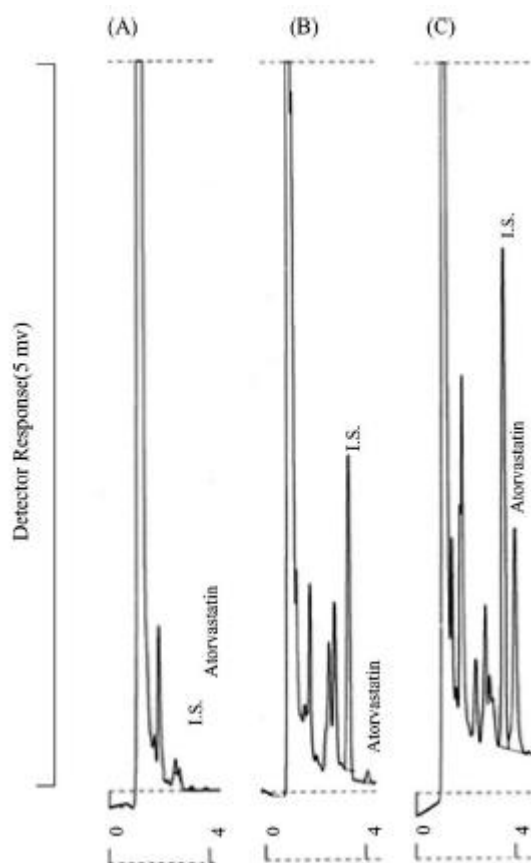
Vzorky séra byly do analýzy uchovávány při –80 °C. Do zkumavky byl přenesen 1 ml plasmy, 100 μl roztoku vnitřního standardu a 1 ml fosfátového pufru (0.1 M, pH 7), obsah zhomogenizován a extrahován ethylacetátem. Po homogenizaci a centrifugaci, byla organická fáze odpařena do sucha při 50°C v atmosféře dusíku. Odparek byl rekonstituován v methanolu a 20 μl vzorku bylo nastříkováno na kolonu.

Specifičnost a selektivita.

AT a IS byly eluovány v retenčních časech 3.4 a 4.1 min. Žádné endogenní látky ze séra neinterferovaly s elucí léčiva nebo IS. Na obr. 20 jsou typické chromatogramy blank séra, blank séra obsahujícího LOQ atorvastatinu a vzorku séra dobrovolníka. Stejným způsobem byla zkoušena selektivita metody s několika potenciálně současně podávanými léčivy zahrnujícími diltiazem, furosemid, propranolol, amiodaron, verapamil, cinnarizin, tiklopidin, glibenklamid, methyl dopu, prazosin, theofyllin, hydrokortison, omeprazol, cimetidin, naproxen, indometacin, celecoxib, ibuprofen, acetaminofen, diazepam, chlordiazepoxid, oxazepam, karbamazepin, lamotrigin, aspirin a salicylovou kyselinu. Všechna léčiva byla

zkoušena v koncentracích 10–100 µg/ml. Podle výsledků se stanovením interferují pouze ibuprofen (4.2min), diazepam (3.3min) a celecoxib (3.7 min).

Jako u jiných statinů jsou plasmatické hladiny po jednorázovém podání AT velmi nízké, a proto je při volbě HPLC/UV metody nutné vyvinout velmi účinnou extrakční techniku, přičemž se stanovením léčiva nesmí interferovat jiné látky. Byly vyzkoušeny různé extrakční techniky včetně precipitace proteinů a LLE. Přímá precipitace proteinů poskytuje malý výtěžek s přítomností endogenních nečistot na chromatogramu. AT je málo rozpustný ve většině organických rozpouštědel, proto byla testována extrakční účinnost v různých rozpouštědlech jako ethylacetát, hexan, diethylether, dichlormethan a chloroform, zvláště či v kombinaci s různým množstvím 2-propanolu nebo isoamylalkoholu. Léčivo a IS byly extrahovatelné pomocí ethylacetátu a diethyletheru, účinněji ale do ethylacetátu. Čištění vzorku zpětnou extrakcí do kyseliny či báze velmi snížilo podíl interferujících látek, ale také účinnost extrakce. Dále byla provedena ředění vzorku séra různým množstvím různých roztoků pufrů (různé pH a iontová síla); *přídavek stejného objemu fosfátového pufru (pH 7.4, 0.1 M) zvýšil výtěžky a významně snížil interferenční potenciál endogenních látek.* Na rozdíl od časově náročné a několikastupňové extrakce vzorku (Bullen, W.) využívá tato metoda jednoduchou extrakci do ethylacetátu.



Obr. 20. Typické chromatogramy (A) lidské blank plasmy (B) lidské plasmy s obsahem AT a IS v koncentracích 4 ng/ml (C) séra dobrovolníka odebraného 4 h po podání 40 mg atorvastatinu s obsahem 50 ng/ml atorvastatinu. Léčivo bylo eluováno ve 3.4 min a vnitřní standard ve 4.1 min (15).

Při určování optimálního složení mobilní fáze bylo zjištěno, že iontová síla pufru hraje významnou úlohu v rozlišení chromatogramů. V podstatě, zvýšení molarity fosfátového pufru z 0.005 na 0.05 M dramaticky zvýšilo rozlišení píků AT a IS od píků endogenních látek. Při hledání optimální vlnové délky byla zjištěna maximální absorpce při dvou vlnových délkách, 206 a 247 nm. Vyšší citlivost stanovení byla zjištěna při vlnové délce 206 nm, ale stanovení rušilo více interferujících píků. Bylo vyzkoušeno mnoho léčiv při výběru IS a diklofenak byl vybrán na základě posouzení UV spektra, retenčního času, výtěžnosti a rozlišení od léčiva a endogenních píků.

Aplikace metody.

Metoda byla aplikována v randomizované bioekvivalenční studii dvou přípravků s AT u 12 zdravých dobrovolníků. Byla podána perorální jednotlivá dávka 40 mg AT v přípravku fy Arya (Teherán, Irán) nebo Pfizer (Austrálie). Vzorby byly odebírány ve vhodných intervalech po dobu 48 h. Získané farmakokinetické parametry jsou v následující tabulce.

Tab. 1

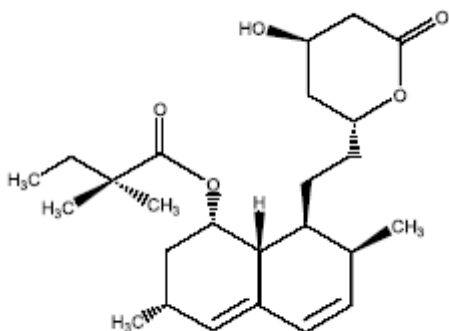
Parameter/prep.	Arya	Pfizer	P-value^a
T_{\max} (h)	3.2 (1.3)	2.30 (0.69)	NS
C_{\max} (ng/ml)	50.1 (30.7)	47.0 (27.5)	NS
AUC_{0-48} (ng h/ml)	787.7 (548.5)	753.3 (533.2)	NS
$AUC_{0-\infty}$ (ng h/ml)	1349.2 (694.5)	1291.1 (550.3)	NS
$T_{1/2}$ (h)	35.7 (15.1)	39.9 (20.3)	NS

^a NS, žádný významný rozdíl ($P < 0.05$).

Popsaná HPLC/UV metoda je jednoduchá, přesná, rychlá a specifická pro stanovení AT v séru. Je vhodná pro farmakokinetické studie i přes nižší citlivost ve srovnání s dříve publikovanými metodami LC/MS. Výsledný limit stanovení je dostačující pro účely farmakokinetických studií (15).

2.6.2 Simvastatin

(1S,3R,7S,8S,8aR)-8-{2-[(2R,4R)-4-hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl]ethyl}-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaftalen-1-yl-2,2-dimethylbutanoát.



2.6.2.1 Klinická farmakokinetika

Simvastatin (SV) je reverzibilní inhibitor mikrozomálního enzymu HMG-CoA reduktázy, široce používaný v léčbě různých typů hypercholesterolemie. SV-methylovaný analog lovastatinu-je syntetizován z fermentačního produktu houby *Aspergillus terreus*. Parentní látka je farmakologicky neaktivní lakton (proléčivo), který je snadno absorbován v žaludeční stěně, vychytáván játry a z velké části přeměňován na několik aktivních metabolitů. Nejdůležitější je simvastatin hydroxykyselina (SVA). Aktivní metabolity mají tendenci hromadit se v játrech, hlavním místě endogenní syntézy cholesterolu. Simvastatin má podobně jako atorvastatin vysoký interakční potenciál s různými léčivy. V případě závažných interakcí s inhibitory CYP450 se simvastatin nepodává či se jeho denní dávka snižuje na 10 mg a méně.

Lineární nárůst inhibiční aktivity SV po podání u lidí je v dávkovém rozmezí od 5 do 120 mg/den (16).

2.6.2.2 Přehled analytických metod

SV a SVA jsou v plasmě přítomné v nízkých koncentracích v důsledku rozsáhlého jaterního metabolismu, který je příčinou nízké dostupnosti SV po perorálním podání (~ 5%) (17). Podle literárních zdrojů jsou předpokládané koncentrace v lidské plasmě po podání 80 mg SV mezi 0.2 a 15.0 ng/ml. Spolehlivé monitorování těchto plazmatických hladin vyžaduje limit kvantifikace 0.10 ng/ml (16). Pro terapeutické monitorování hladin léčiva jsou tedy vyžadovány citlivé a selektivní metody (17).

Metody plynové chromatografie-hmotnostní spektrometrie (GC-MS) jsou velmi citlivé a selektivní, vhodné pro stanovení terapeutických plazmatických hladin SV a SVA (T. Takano (38); M.J. Morris (4)), ale příprava vzorku před analýzou je značně složitá. Dále existují HPLC metody stanovení SV a SVA. Metody kapalinové chromatografie s UV detekcí (LC-UV) jsou jednodušší než GC-MS, ale nejsou dostatečně citlivé pro stanovení hladin léčiva

v terapeutických dávkách (L. Wang (27); G. Carlucci (39)). Metoda HPLC s fluorimetrickou detekcí autorů *H. Ochiai et al.*(20) je značně citlivá, hlavní nevýhodou však je, že je třeba provést kompletní derivatizaci (16). Navíc, pro stanovení proléčiva a aktivní látky je zapotřebí provést dvě paralelní analýzy (19).

Pro stanovení léčiv a metabolitů v biologických tekutinách jsou žádoucí rychlé a účinné metody. Vhodnou metodou je HPLC–MS/MS. V poslední době již bylo publikováno několik HPLC–MS/MS metod stanovení SV. X.S. Miao (40) popisuje HPLC metodu s MS/MS detekcí stanovení SV ve vodném prostředí s limitem stanovení 1 ng/ml, který je příliš vysoký pro účely farmakokinetické studie (FK studie). Další autor *H. Yang (18)* představuje HPLC–MS metodu stanovení SV v plasmě s dostatečnou citlivostí, ale žádná z těchto metod nezahrnuje stanovení metabolitů SV. SV současně s jeho metabolitem byl stanoven *Jemalem et al.*(19). Autoři spojili on-line SPE s LC-MS/MS a prezentovali velmi citlivou metodu s limitem kvantifikace 0.5 ng/ml. *Barrett et al. (16)* vyvinuli HPLC–MS/MS metodu stanovení SV a SVA v lidské plasmě s limitem kvantifikace 0.1 ng/ml použitelnou v rutinní analýze vzorků ve FK studii a pro určení FK parametrů zkoumaného léčiva (16). *Zhao et al. (17)* dosáhli limitu kvantifikace SV a SVA 0.05 ng/ml metodou LLCE-HPLC-MS/MS (17).

2.6.2.3 Validovaná HPLC-MS/MS metoda současného stanovení simvastatinu a simvastatin hydroxykyseliny v lidské plasmě

B. Barrett et al. (16)

Metoda slouží ke stanovení nejvýznamnějšího léčiva mezi statiny, simvastatinu (SV) a jeho metabolitu simvastatin hydroxykyseliny (SVA). Je velmi citlivá a selektivní. Detekce byla uskutečněna na ESI (electrospray ionization) hmotnostním spektrometru s trojitým kvadrupolem pracujícím v režimu pozitivní i negativní ionizace. Při MS/MS detekci byl použit MRM (multiple reaction-monitoring) režim. Kalibrační křivky byly lineární v rozmezí koncentrací SV 0.10–16.00 ng/ml a SVA 0.10–16.00 ng/ml. Správnost a přesnost byly charakterizovány pomocí R.S.D. a procentuální odchylkou s oběma hodnotami nižšími než 7% pro všechny analyty. Limit detekce SV byl 0.03 ng/ml a SVA 0.02 ng/ml. Metoda byla použita ve farmakokinetické studii SV.

Hmotnostní spektrometrie.

Hmotnostní spektrometrie byla provedena v hmotnostním spektrometru Quattro micro™ s trojnásobným kvadrupolem (Micromass, UK) vybaveném ESI zdrojem. Pro stanovení SV a SVA byl použit MRM vzhledem k vysoké selektivitě. K detekci SV a vnitřního standardu lovastatinu (LV) byly použity pozitivní ionty jako prekurzory, k detekci SVA a vnitřního standardu lovastatin hydroxykyseliny (LVA) negativní ionty.

Kapalinová chromatografie.

Pro separaci byl použit Waters 2695 kapalinový chromatograf (Waters, USA) s Discovery C₁₈ kolonou (50 mm × 4.6 mm, 5 μm). Mobilní fázi tvořila směs acetonitril:methanol:0.1 M octan amonný (62:10:28, v/v/v), pH nebylo upraveno. Průtoková rychlost byla 0.8 ml/min a nastřikovaný objem 70 μL.

Příprava standardních a kontrolních vzorků.

Zásobní roztoky SV a SVA byly připraveny rozpuštěním příslušného množství látky v acetonitrilu:vodě (75:25, v/v) a zředěny stejným rozpouštědlem na pracovní roztoky. Kontrolní vzorky byly připraveny stejným způsobem. Bylo potvrzeno, že vzorky plasmy jsou stabilní při -75 ± 5 °C po 3 měsíce.

Zásobní roztok vnitřního standardu lovastatinu (LV) a lovastatin hydroxykyseliny (LVA) byl připraven rozpuštěním látek v acetonitrilu:vodě (75:25, v/v). Pracovní roztok vnitřního standardu (W.I.S.) obsahující LV i LVA byl připraven ředěním stejným rozpouštědlem na konečnou koncentraci obou látek 1 μg/ml. Zásobní roztok byl stabilní při 4°C 5 dní. K 1ml plasmy byl přidán objem 50 μl W.I.S.

Příprava vzorků.

Při přípravě vzorku byla použita extrakce na pevnou fázi (SPE). W.I.S. byl přidán k 1 ml plasmy obsahující analyty. Vzorek byl zředěn 1 ml vody a zhomogenizován. Směs byla přenesena na Oasis HLB cartridge (30 mg, 1 ml) aktivovanou methanolem a promyta vodou. SPE cartridge s vloženým vzorkem byla promyta vodou a následně byl analyt eluován směsí acetonitrilu:0.1 M octanu amonného (75:25), pH bylo upraveno na 4.5 kyselinou octovou. Po centrifugaci byl eluát nastřikován na kolonu.

Provedení MS/MS.

Byla použita ESI za účelem dosažení dostatečné citivosti, fragmentace a linearity odpovědi. Byla také hodnocena APCI (atmospheric pressure ionization) bez výrazně lepších výsledků. Prvním krokem při vývoji metody detekce je vybrat prekurzorový ion pro další štěpení. Pozitivní ionty jsou vhodné u sloučenin ve formě laktonů, zatímco negativní ionty jsou běžně monitorovány při detekci kyselých sloučenin, tudíž SV a LV byly monitorovány v pozitivním iontovém režimu a SVA a LVA v negativním iontovém režimu. Technika přepínání kolon umožnila stanovit statiny současně v obou formách.

SVA a LVA.

$[M - H]^-$ ionty SVA (m/z 435.3) a LVA (m/z 421.6) byly zvoleny jako prekurzorové ionty pro stanovení metabolitů. Základní píky produktů byly pozorovány v m/z 114.0 a 100.2 pro SVA a LVA. Obě sloučeniny vykazovaly stejné fragmentační chování s nejdůležitějšími fragmentárními ionty vzniklými rozštěpením blízko kruhu.

SV a LV.

Byly hodnoceny různé mobilní fáze (rozpuštědla), různé hodnoty ionizační energie a měněna rychlost průtoku plynu za účelem zachycení parentních iontů $[M + H]^+$ sloučenin laktonů, ale oproti publikovaným výsledkům (M. Jemal, 2000) tyto snahy nevedly k získání očekávané intenzity signálu. Jediný signál, který byl v požadované intenzitě byl poskytován adukčními ionty $[M + CH_3CN + Na]^+$ (SV m/z 481.2, LV m/z 467.1).

Produkty SV a LV s nejintenzivnějším signálem vznikly ztrátou neutrálního acetonitrilu za vzniku $[M + Na]^+$ iontů (SV m/z 440.9, LV m/z 426.7). Signály získané štěpením blízko kruhu podobně jako v případě hydroxykyselin byly také pozorovány u LV za určité optimalizace podmínek, ale intenzita odpovědi byla příliš nízká pro zamýšlené účely. Fragmentace aduktů parentních iontů se ukázala být reprodukovatelná a užitečná pro stanovení SV a LV.

Provedení LC.

Byly použity různé analytické kolony (Discovery C_8 , C_{18} Supelco a RP Amide C_{16}) za účelem získání nejlepších výsledků v přiměřeném čase. Při použití C_8 stacionární fáze bylo obtížné získat symetrický tvar píků, zatímco u RP Amide C_{16} zakotvené fáze byly retenční časy nepřijatelně dlouhé. Kolona *Discovery* C_{18} Supelco (50 mm × 4.6 mm, 5 μ m) byla vybrána proto, že byl získán ideální tvar píků a nejlepší výsledky v přijatelném čase. Dalším kritickým faktorem byl výběr složek mobilní fáze. Neboť při MS nemůže být použit fosforečnanový pufr, k zabezpečení iontové síly mobilní fáze byl přidán octan amonný. Zvyšování procentuálního zastoupení tlumivého roztoku v mobilní fázi zvýšilo symetrii píků a stupeň rozlišení, ale zároveň prodloužilo retenční časy SVA a LVA. Nakonec tedy byla použita tříložková mobilní fáze obsahující *methanol*, *acetonitril* a *pufr* s dosažením uspokojivých výsledků.

Specifičnost a selektivita.

Byly srovnány chromatogramy blank plasmy a plasmy obsahující SV a SVA (0.10 ng/ml) a LV a LVA (1 μ g/ml). Retenční časy SV a SVA byly 3.5 a 1.7 min, zatímco LV a LVA 3.0 a

1.6 min. Žádné endogenní složky interferující se stanovením analytů a jejich vnitřních standardů nebyly nalezeny.

Limit detekce a kvantifikace.

Limit detekce byl vypočítán na 0.03 ng/ml pro SV a 0.02 ng/ml pro SVA.

Nejnižší limit kvantifikace (LOQ) je definován jako nejnižší koncentrace analytu stanovená s přijatelnou přesností a správností (20%), zde 0.10 ng/ml pro oba analyty, což je dostačující pro účely FK studie.

Tato metoda je citlivější než dříve publikovaná metoda s on-line extrakcí na pevnou fázi (M. Jemal, (19)). Citlivost této metody by byla pravděpodobně zvýšena zvýšením nastříkovaného objemu. Tato možnost však musí být zhodnocena s ohledem na existenci SPE kolony.

Závěr.

Validovaná metoda současného stanovení simvastatinu a jeho metabolitu simvastatin hydroxykyseliny v lidské plasmě s obsahem Na₂EDTA pokrývá koncentrační rozmezí 0.10–16.00 ng/ml s použitím 1 ml plasmy. Ve vzorcích plasmy nebyly nalezeny žádné interferující endogenní látky ani nebyl pozorován “cross-talk” efekt. Jednoduchá příprava vzorku a krátký retenční čas umožňují analýzu více než 250 vzorků denně. (16).

2.6.2.4 Současné stanovení simvastatinu a příslušné β -hydroxykyseliny v lidské plasmě kapalinovou chromatografií/ tandemovou hmotnostní spektrometrií po LLC extrakci

Jamie J. Zhao, Iris H. Xie, Amy Y. Yang, Brad A. Roadcap and J. D. Rogers (17)

Byla validována citlivá a spolehlivá metoda současného stanovení simvastatinu (SV) a jeho aktivního metabolitu ve formě β -hydroxykyseliny (SVA) v lidské plasmě. Analyty byly z plasmu extrahovány současně do methyl-terc-butyletheru (MTBE) v extrakční cartridge Chem Elut (tzv. liquid-solid extraction (LSE) či liquid-liquid cartridge extraction (LLCE)), separovány na koloně Kromasil C₁₈ (50 × 2 mm i.d., 5 μ m) a detekovány tandemovou hmotnostní spektrometrií. Jako vnitřní standardy byly použity analogy značené stabilními isotopy ¹³CD₃-SV a ¹³CD₃-SVA. Simvastatin byl detekován v pozitivním a SVA v negativním iontovém režimu; změna polaritativy byla uskutečněna během analýzy. Při použití Chem Elut cartridge byla dosažena dobrá výtěžnost a současně byl redukován stupeň vzájemné konverze mezi SV a SVA na nedetekovatelnou (laktonizace SVA) či zanedbatelnou (<0.07% hydrolyza SV) hladinu. Výtěžnost SV a SVA byla v průměru 78% a 87%. Analyty byly stabilní v rekonstitučním roztoku při 4 °C nejméně 24 h. Limit stanovení (LOQ) byl **50 pg/ml** pro oba analyty, kalibrační křivka byla lineární v rozmezí koncentrací 0.05-50 ng/ml. Metoda je vhodná pro analýzu v klinické praxi.

Současné stanovení SV a SVA v biologických vzorcích, zahrnující redukovanou dobu přípravy i analýzy vzorku, bylo zpočátku považováno za nereálné vzhledem k rozdílným polaritám analytů. Tato metoda byla později vyvinuta pro lovastatin a odpovídající β -hydroxykyselinu v plasmě zvířat a pro SV a SVA v lidské plasmě s použitím SPE a LC/MS/MS se změnou polaritativy z pozitivního režimu (laktony) na negativní (kyseliny). Detekovány byly iontové adukty [M+Na]⁺ LV a SV. Neboť pH použité při extrakci bylo nízké, představovala interkonverze laktonů a kyselých forem potenciální problém. Zhao et al. vyvinuli LC/MS/MS metodu s extrakcí do kapaliny (LLE), kterou lze současně stanovit SV a SVA v lidské plasmě v množství 0.05 ng/ml (LOQ). Podobná metoda stanovení atorvastatinu dosahuje LOQ 0.5 ng/ml. U tohoto stanovení jsou obě formy atorvastatinu detekovány v pozitivním iontovém režimu. Metoda LLE LC/MS/MS stanovení SV a SVA přinesla zjednodušení přípravy vzorku a zvýšení extrakční účinnosti. V průběhu extrakce vzorku se vyskytla v malé míře (< 0.5%) přeměna mezi SV a SVA, a proto byla navržena *alternativní LC/MS/MS metoda využívající Chem Elut extrakční cartridge* (tzv. liquid-liquid cartridge extrakci; LLCE nebo liquid-solid extrakci; LSE) umožňující přesnější stanovení analytů v plasmě.

LC/MS/MS zařízení a analytické podmínky.

Chromatografický systém byl vyroben v Shimadzu Scientific Instruments (Columbia, MD, USA). Separace proběhla na koloně Kromasil C₁₈ (50 × 2 mm i.d., 5 μ m) (Keystone Scientific, Bellefonte, PA, USA) za běžné teploty. Mobilní fáze byla připravena smísením 750 ml acetonitrilu s 250 ml 1 mM octanu amonného s pH upraveným na 4.5 kyselinou mravenčí. Teplota vzorku v autosampleru byla udržována na 4 °C.

Pro stanovení a detekci byl použit PE SCIEX API 365 hmotnostní spektrometr s trojitým quadropolem (Perkin-Elmer SCIEX Instruments, Concord, ON, Kanada). Při stanovení byl využit selektivní reakční monitoring (SRM) pro spektra iontových přechodů prekurzor-produkt m/z 439.2 [M-H]⁻ → 319.1 (pro ¹³CD₃-SVA), m/z 435.2 [M-H]⁻ → 319.1 (pro SVA),

m/z 423.1 $[M+H]^+ \rightarrow 285.1$ (pro $^{13}\text{CD}_3\text{-SV}$) a m/z 419.1 $[M+H]^+ \rightarrow 285.1$ (pro SV). Hmotnostní spektrometr byl nastaven na negativní režim v prvních 2 minutách, poté na pozitivní režim.

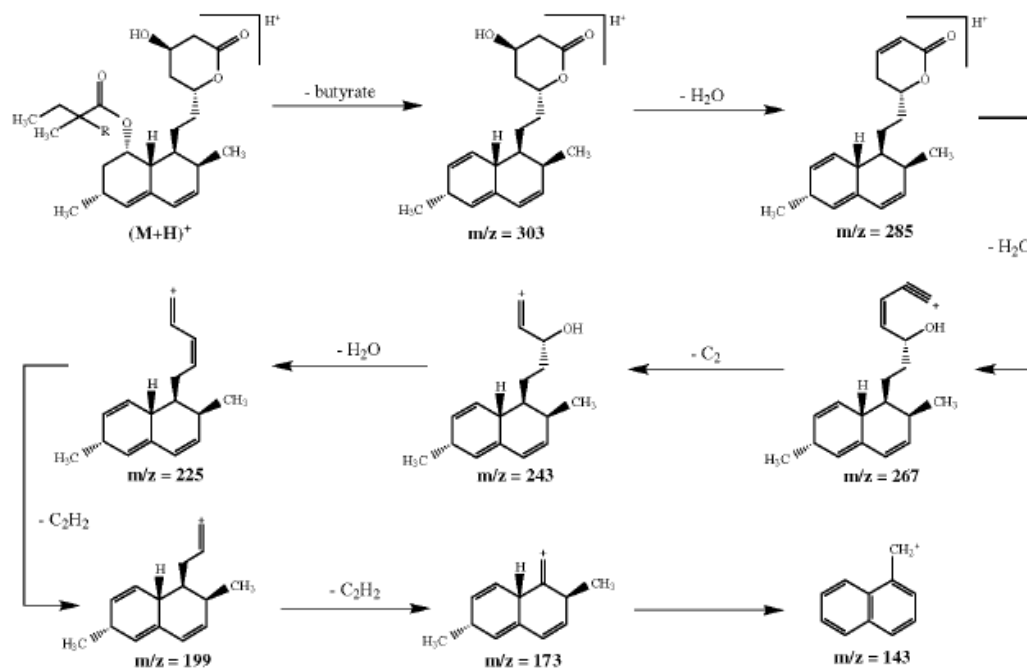
Extrakce vzorku plasmy.

Po přidavku vnitřního standardu a octanového pufru (pH 4.5) byl obsah zhomogenizován a přenesen na Bond Elut extrakční cartridge. Asi po 5 min (kompletní prolnutí cartridge vzorkem a navázání součástí plasmy na její obsah) byly analyty eluovány třikrát MTBE. Eluát byl odpařen v atmosféře dusíku a odparek rozpuštěn ve směsi acetonitril-octan amonný 1 mM o pH 4.5 (70:30) a přenesen do autosampleru.

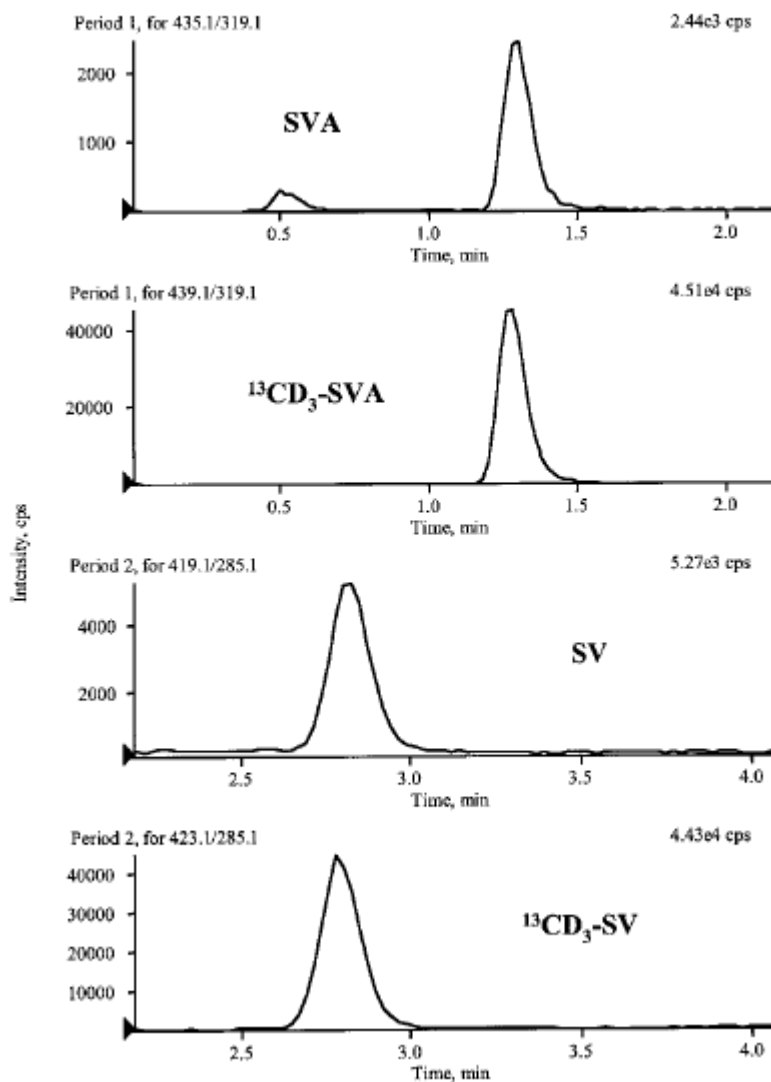
Spektrometrická detekce.

Hlavními prekurzory SV a $^{13}\text{CD}_3\text{-SV}$ v detektoru byly jejich protonované molekuly $[M+H]^+$. Rovněž byly pozorovány adukty se sodnými, draselnými a amonnými kationty. Amonné kationty pocházejí z acetátového pufru použitého v mobilní fázi. Sodné a draselné kationty zřejmě pocházejí z biologické matrix či ze skleněných zkumavek použitých při přípravě a stanovování. Adukt SV se sodnými kationty je citlivěji detekován než protonovaný SV za standardních podmínek, neboť v prvním případě vzniká jeden hlavní prekurzor a jeho produkty, zatímco v druhém vzniká několik hlavních iontů i produktů. Proto byl adukt se sodnými kationty použit jako prekurzor u jiných LC/MS/MS metod. Nicméně obsah sodných kationtů nelze během přípravy a stanovení zcela kontrolovat, a proto se množství jejich aduktů s analytem může měnit. Z tohoto důvodu byl vybrán protonovaný SV jako prekurzor. Aby byl redukován obsah sodných kationtů a poskytnuty podmínky pro vznik kationtů $[M+H]^+$, neměly by být používány skleněné nádoby a rozpouštědla obsahující methanol. Spektra produktů SV a $^{13}\text{CD}_3\text{-SV}$ poskytla několik fragmentárních iontů: m/z 143, 173, 199, 225, 243, 267, 285 a 303 (obr.21). Spektra produktů SVA a $^{13}\text{CD}_3\text{-SVA}$ poskytla pouze dva fragmentární ionty; m/z 319 a 115. Jako hlavní produkt byl vybrán ion m/z 319 vzniklý ztrátou butyrylové části. Fragmenty pocházející ze štěpení SV nebyly pozorovány, vzhledem ke stabilitě otevřené kyselé formy.

pH mobilní fáze bylo upraveno na 4.5 pomocí octanu amonného. Retenční čas SVA v první periodě byl 1.3 min a SV ve druhé periodě 2.7 min. SRM iontové chromatogramy plasmy subjektu 2 h po jednorázovém perorálním podání 20 mg SV jsou na obr. 22.



Obr. 21. Předpokládaný způsob fragmentace SV a $^{13}CD_3$ -SV (17).



Obr. 22. SRM chromatogramy vzorků plasmy subjektu 2 h po perorálním podání 20 mg SV (17).

Vzájemná konverze SV a SVA během přípravy vzorku.

Během přípravy vzorku mohou analyty snadno podléhat laktonizaci (SVA → SV) a/nebo hydrolýze (SV → SVA), a to za podmínek vysokého nebo nízkého pH v kombinaci s extrakcí do organického rozpouštědla. Tyto reakce mají za následek méně přesné stanovení analytů. U metod využívajících SPE nebo LLE dochází k určitému stupni konverze. U SPE je stupeň konverze obvykle vyšší než u LLE. Stupeň konverze byl redukován na 0.5% u LLE metody. V tomto případě je chyba ve stanovení malá, pokud jsou plasmatické koncentrace SV a SVA srovnatelné. V krajním případě, kdy se koncentrace jednoho analytu přibližuje hornímu limitu stanovení (ULQ), zatímco druhý se vyskytuje v koncentraci blízké nejnižší stanovitelné mezi (LOQ), vliv na stanovení analytu přítomném v nízké koncentraci bude významný.

Redukce vzájemné konverze, nutné k vyvinutí přesné a spolehlivé metody, byla dosažena s použitím Varian Chem Elut extrakční cartridge. Obsahuje hydrofilní matrix (ochranná

známka Hydromatrix) tvořenou tavenou křemelinou vysokého stupně čistoty. Během extrakce je vodná složka (plasma a látky v ní rozpuštěné) adsorbována na výplňový materiál, zatímco organické rozpouštědlo eluuje analyzované složky. Při použití Chem Elut extrakční cartridge nebyla pozorována laktinizace a hydrolýza byla snížena na zanedbatelnou úroveň (<0.07%). V Tab.2 jsou srovnány 3 různé extrakční metody.

Tab.2. *Výtěžnost SV a SVA a stupeň vzájemné konverze během extrakce vzorku.*

Extraction procedure	Extraction recovery (%) ^a		Interconversion (%) ^b	
	SV	SVA	SV → SVA	SVA → SV
Solid-phase (previous work ¹⁰)	75.4	68.3	0.60	3.00
Liquid–liquid (previous work ¹¹)	80.6	95.6	0.12	0.49
Chem Elut cartridge (this work)	78.1	87.2	0.06	0

Extrakční účinnost.

Při zvyšování výtěžnosti SV a SVA bylo zároveň usilováno o snižování stupně jejich vzájemné konverze. Optimální pH pro extrakci je mezi 4 a 5. pH > 5 snižuje výtěžnost SVA, která se nachází v ionizované formě, tudíž nepřechází do organického rozpouštědla. Při pH < 4 je zvýšený stupeň konverze. Ze tří zkoušených hodnot pH mezi 4 a 5 bylo vybráno *pH 4.5*. Nejlepší extrakční účinnost vykazoval *MTBE*; její hodnoty byly 78.1% pro SV a 87.2% pro SVA. Přestože byla výtěžnost s použitím Chem Elut cartridge mírně nižší než u LLE metody, její výhodou zůstává nízký stupeň konverze.

Závěr.

Metoda umožňuje současné stanovení SV a SVA v lidské plasmě v koncentracích až 50 *pg/ml (LOQ)* s použitím 0.5 ml plasmy.

Způsob úpravy vzorku a extrakce z plasmy umožňují snížit stupeň konverze mezi SV a SVA na nedetekovatelnou či zanedbatelnou (<0.07%) mez. Extrakce na Chem Elut cartridge je jednoduchá, účinná a automatizovatelná. Metoda byla použita při stanovení plasmatických koncentrací léčiva ve vzorcích lidské plasmy (17).

2.6.2.5 Stanovení simvastatinu v lidské plasmě kapalinovou chromatografií-hmotnostní spektrometrií

Haitao Yang , Yan Feng , Yiwen Luan (18)

Byla vyvinuta jednoduchá, citlivá a selektivní metoda kapalinové chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (LC/ESI/MS) pro stanovení simvastatinu (SV). Po extrakci do ethylacetátu s použitím lovastatinu (LV) jako vnitřního standardu byly analyty separovány na C₁₈ koloně mobilní fázi tvořenou směsí methanolu a vody (9:1). Detekce byla provedena po ionizaci za atmosférického tlaku na hmotnostním spektrometru s jedním kvadrupolem vybaveným ESI (electrospray ionization) v pozitivním nastavení. Simvastatin byl stanoven srovnáním poměru ploch píků SV/LV extraktů analyzovaných v režimu SIM, tj. single ion monitoring, (m/z 441 a m/z 427 pro I a II) s kalibrační křivkou ($r = 0.9997$). Limit detekce byl 0.05 ng/ml.

Podle literárních zdrojů lze očekávat plasmatické koncentrace léčiva mezi 0.1 a 15 ng/ml. Nová metoda LC/ESI/MS slouží k přímému stanovení simvastatinu v lidské plasmě v koncentracích 0.1-20 ng/ml.

Technické vybavení a chromatografické podmínky.

Analýzy byly provedeny s použitím LC-MS systému Agilent 1100 (Hewlett-Packard). Pro chromatografickou separaci byla použita Shimadzu ODS kolona (5 μ m, 4.6 \times 150 mm I.D.). Mobilní fázi tvořil methanol-voda v poměru 9:1. Byla provedena isokratická eluce při 35 °C. Nástřikovaný objem 5 μ l nepředstavoval více než 10% disponibilního objemu. Nástřikem většího množství extrahovaného vzorku lze zvýšit intenzitu signálu.

Simvastatin a lovastatin byly detekovány v pozitivním iontovém režimu SIM (single ion monitoring); simvastatin jako iont $[M+Na^+]$ m/z 441.3 a lovastatin jako iont $[M+Na^+]$ m/z 427.3.

Příprava standardních roztoků a extrakce vzorku.

Zásobní roztoky simvastatinu a vnitřního standardu byly připraveny v methanolu a uchovávány v chladu. V čas potřeby byly zředěním pomocí čistého methanolu připraveny standardní roztoky o žádoucí koncentraci.

Extrakce: Ke vzorku plasmy byl přidán roztok vnitřního standardu, po homogenizaci byl vzorek extrahován ethylacetátem. Po centrifugaci byla organická vrstva přenesena do zkumavky a odpařena do sucha. Před nástřikem na kolonu byl extrakt rozpuštěn v methanolu.

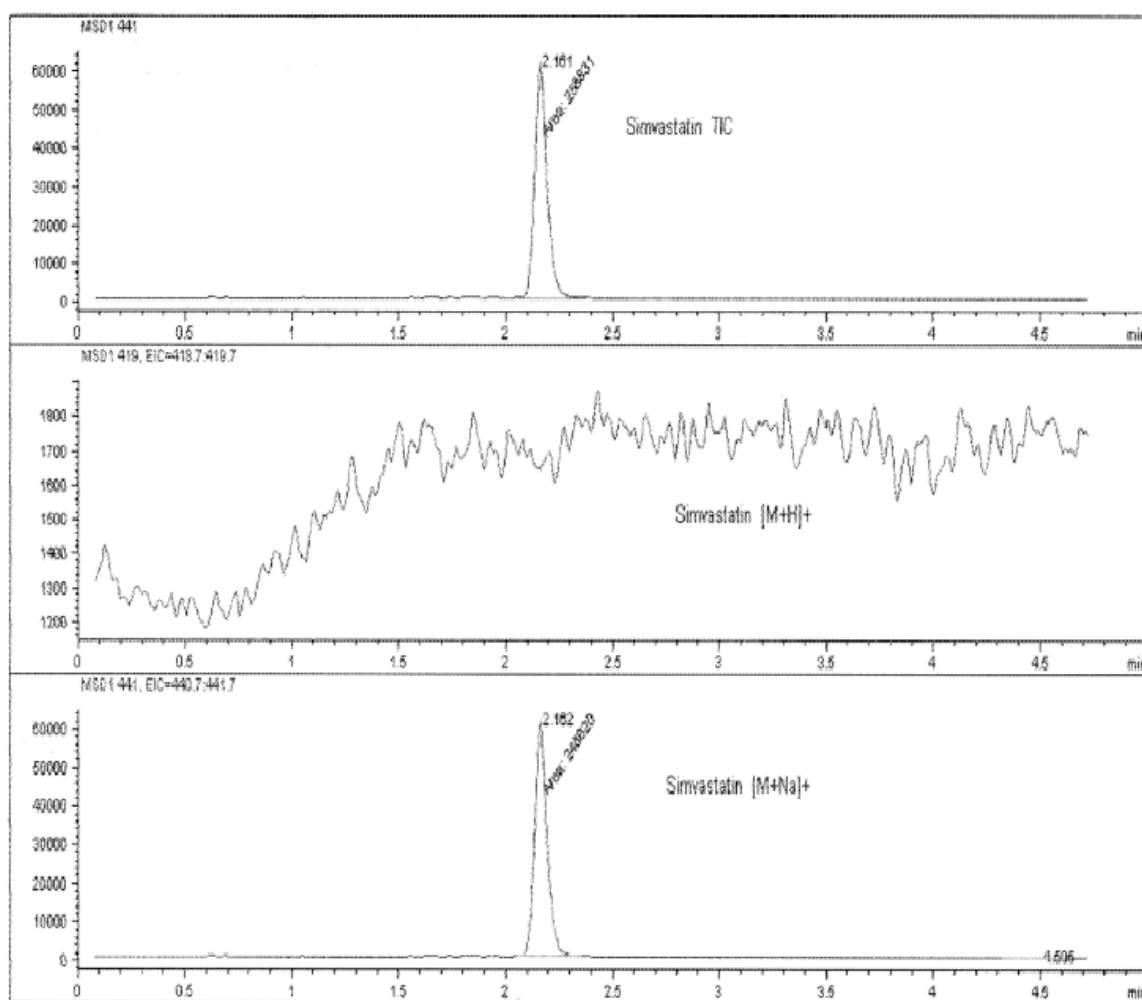
Vývoj metody.

K optimalizaci LC-MS parametrů byla použita metoda průtokové injekční analýzy (FIA). Jedním z nejdůležitějších parametrů je fragmentační napětí, neboť neovlivňuje pouze přenos iontů, ale také disociaci molekul na fragmenty. Za účelem eliminace nežádoucích štěpných reakcí a dosažení maximální odpovědi byly testovány různé hodnoty napětí od 30 do 140 V. Odpověď MS detektoru je shrnuta v Tab. 3 (koncentrace simvastatinu byla 1.0 ng/ml). Bylo zvoleno napětí 70 V.

Tab. 3

Response of Simvastatin at different fragmentor voltage	
Fragmentor voltage (V)	Area of simvastatin [M+Na ⁺]
30	95998
50	227123
70	680109
90	417797
110	224461
140	45759

Při 70 V byly zjišťovány odpovědi detektoru při použití protonované molekuly [M+H⁺] (m/z 419) a adukt se sodným kationtem [M+Na⁺] (m/z 441). Stanovení bylo přesnější při použití aduktu SV se sodným kationtem. Chromatogramy dvou testovaných iontů jsou na obr. 23. Ostatní spektrometrické parametry byly upraveny tak, aby byla získána maximální intenzita odezvy.

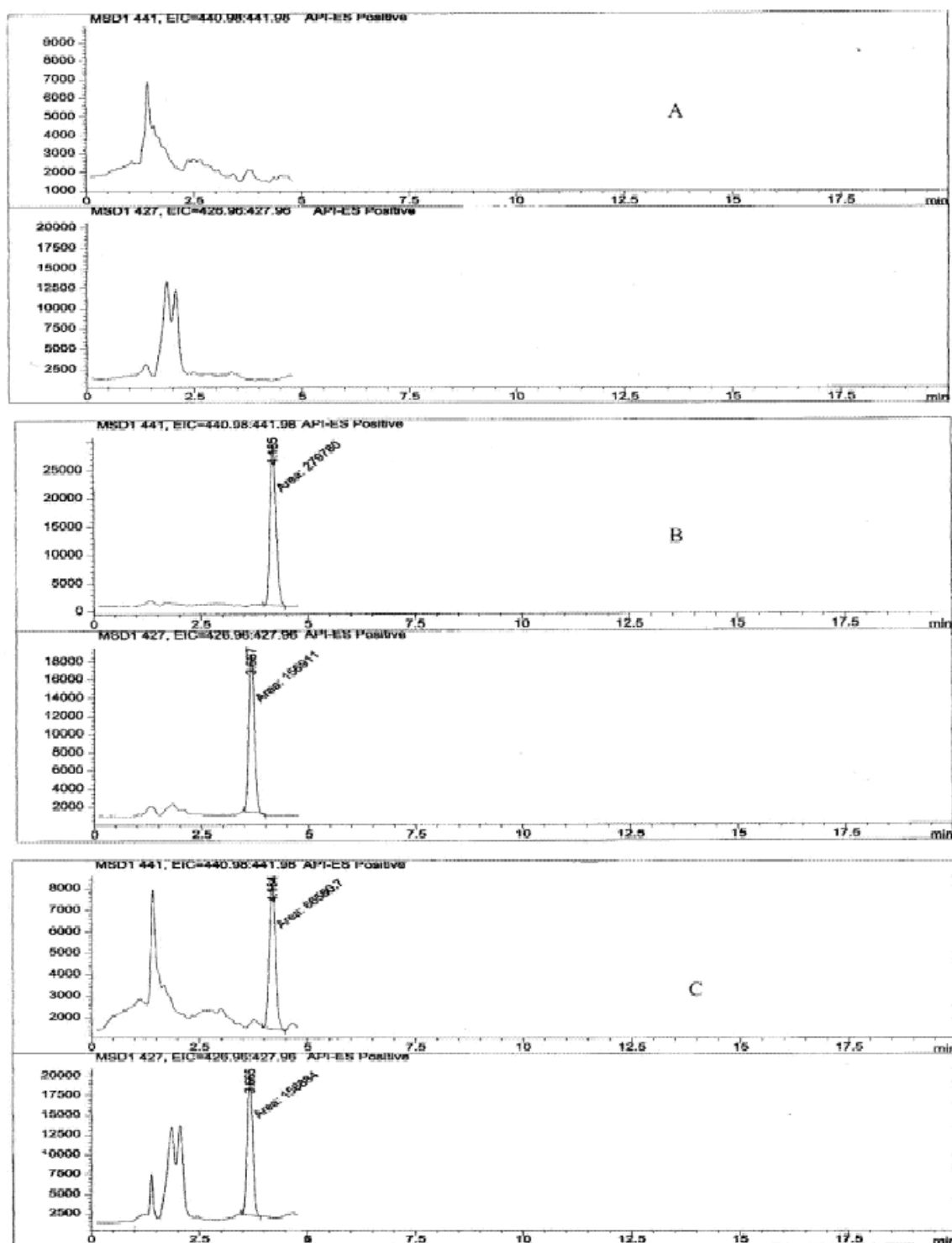


Obr. 23. Výběr iontu pro stanovení simvastatinu (18).

Separace a specifická stanovení.

Typické chromatogramy SV v lidské plasmě jsou na obr.24 (koncentrace simvastatinu 3.5 ng/ml). Podařilo se dosáhnout retenčních časů méně než 5 min pro analyt i vnitřní

standard; SV byl eluovaný v 4.2 min a vnitřní standard v 3.7 min. V plasmě nebyly nalezeny žádné látky interferující se stanovením léčiva ani vnitřního standardu.



Obr. 24. Reprezentativní chromatogramy simvastatinu v lidské plasmě.

(a) blank plasma; (b) plasma obsahující simvastatin a lovastatin; (c) vzorek plasmy odebraný 3 h po perorálním podání 40 mg simvastatinu (18).

Výtěžnost.

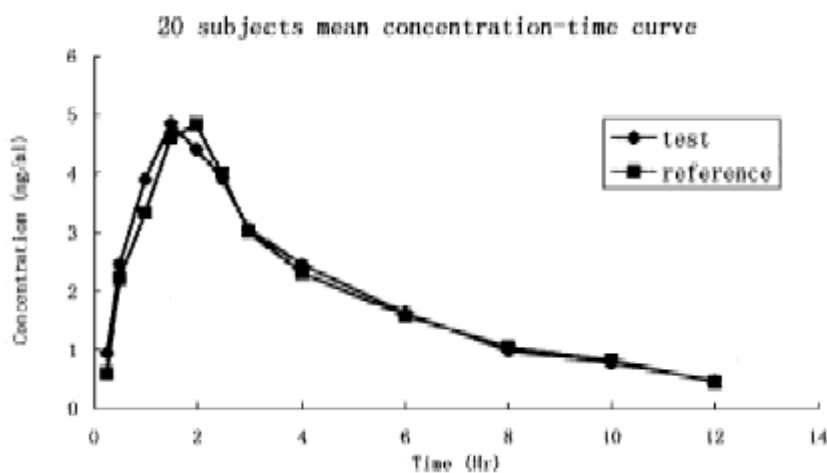
Průměrná výtěžnost SV z lidské plasmy byla $101.4 \pm 8.9\%$ (Tab. 4).

Tab.4

Extraction efficiency of simvastatin ($n=6$)			
Added conc. (ng)	Measured conc. (ng)	Recovery (%)	RSD(%)
0.503	0.54 ± 8.5	107.7	15.2
5.03	4.84 ± 3.7	96.3	5.7
10.06	10.09 ± 3.4	100.3	6.7

Aplikace metody.

Metoda byla aplikována v randomizované studii. Na obr. 25 je křivka závislosti koncentrace simvastatinu (testované léčivo) a referenčního léčiva (přípravek Zocor) na čase. Stanovitelné hladiny léčiva byly detekované až 12 h po perorálním podání. Maximální průměrné plasmatické koncentrace léčiva a referenční látky byly 4.9 až 13.4 ng/ml. Eliminační poločas byl 3.6 až 3.5 h. Stanovené plasmatické koncentrace byly podobné koncentracím stanoveným GC-MS metodou a LC metodou s fluorimetrickou detekcí.



Obr. 25. Plasmatické koncentrace simvastatinu po podání dvojité dávky léčiva (18).

Metoda LC-MS umožňuje správné, přesné a spolehlivé stanovení koncentrace simvastatinu v lidské plasmě až 12 h po perorálním podání 40 mg léčiva. Stanovení je rychlé a jednoduché, celková doba analýzy jednoho vzorku je méně než 5 min. Hlavní výhodou této metody je způsob přípravy vzorku (jednoduchá extrakce) a rychlost separace (18).

2.6.2.6 Současné stanovení simvastatinu a odvozené kyseliny LC-MS-MS metodou po přímém nástřiku vzorku plasmy

Mohammed Jemal, Zheng Ouyang, Mark L. Powell (19)

Metoda umožňuje současné stanovení simvastatinu (SV) a metabolitu-simvastatin kyseliny (SVA) po přímém nástřiku plasmy metodou kapalinové chromatografie/tandemové hmotnostní spektrometrie. Vzorky plasmy jsou přeneseny do LC-MS-MS systému po přidavku vnitřního standardu ve vodném roztoku pufru a centrifugaci. Analyty jsou v pufrované plasmě stabilní nejméně 24 h při teplotě 4 °C. Za podmínek nízké teploty (4 °C) a nízkého pH (4.9) je minimalizována hydrolýza SV (a laktonizace SVA) na hodnoty $\leq 1.0\%$. Celkový čas analýzy zahrnující úpravu vzorku a samotné stanovení je 2.5 min, při současném dosažení separace píku SV od píku SVA na základní linii. Při nástřiku pouhých 8 μl bylo dosaženo nejnižšího limitu stanovení 0.5 ng/ml.

Prezentovaná metoda byla vyvinuta pro současné stanovení SV a SVA; nezahrnuje proces přípravy vzorku kromě přidavku roztoku vnitřního standardu (lovastatin a odvozená kyselina) před nástřikem do LC-MS-MS systému. Celkový čas analýzy je pouze 2.5 min.

Analytický systém.

Pro extrakci plasmy byla on-line zapojena Oasis[®] HLB kolona (1 × 50 mm, 30 μm) od Waters (Milford, MA, USA). Jako analytická kolona byla použita Symmetry C₁₈ kolona (3.9 × 50 mm, 5 μm), Waters. K detekci byl použit hmotnostní spektrometr Finnigan TSQ-7000 s trojitým kvadrupolem (San Jose, CA, USA).

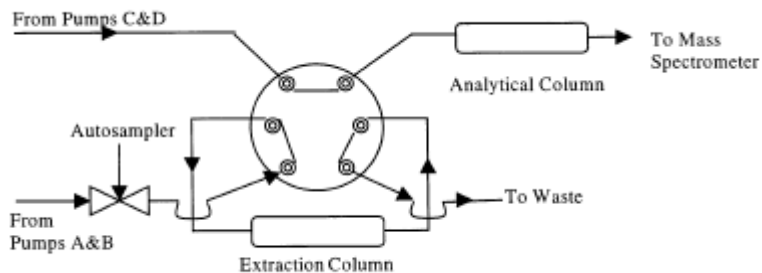
Příprava vzorku.

Ke vzorku byl přidán pracovní roztok vnitřního standardu (v 0.1 M octanovém pufru, pH 4.2). Výsledné pH vzorku bylo 4.9. Vzorky byly zhomogenizovány a centrifugovány. Výsledná koncentrace vnitřního standardu v lidské plasmě byla 50 ng/ml. Takto upravené vzorky byly nástřikovány do LC-MS-MS systému.

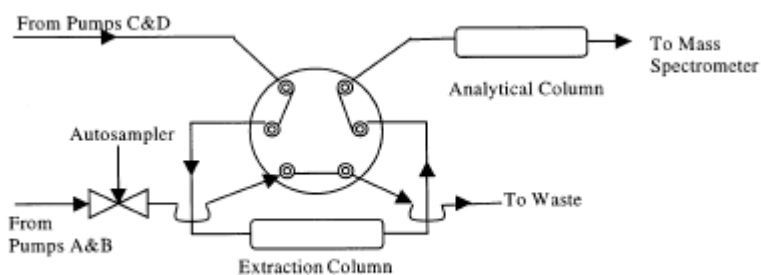
Chromatografické podmínky.

Na obr. 26 je schematicky znázorněn použitý analytický systém. 26a) extrakční fáze: vzorek je promýván na extrakční koloně mobilní fází složenou z 10% acetonitrilu a 90% vodného roztoku mravenčí kyseliny 3.0 mM po dobu 0.3 min. 26b) eluční fáze: Poté je přepnutím ventilu tok nasměrován na analytickou kolonu a mobilní fáze změněna na 75% acetonitril a 25% vodný roztok mravenčí kyseliny 3.0 mM. Tok vycházející z analytické kolony je zpomalen tak, aby procházelo do hmotnostního spektrometru pouze 50% eluátu. Eluční fáze na analytické koloně probíhá současně s vyrovnávací fází na extrakční koloně, která je promývána gradientem mobilní fáze (100% až 10% acetonitrilem) a ustalována mobilní fází stejného složení jako při extrakci.

Retenční časy SV, SVA, LV a LVA byly 2.06, 1.49, 1.68 a 1.30 min.



a) dávkování vzorku, extrakce, ustalování kolony



b) eluce analytů

Time	Flow rate (mL/min)				Configuration	On-line extraction stage
	Pump A	Pump B	Pump C	Pump D		
0.00	3.6	0.4	0.25	0.75	(a)	Extraction and cleanup
0.30	3.6	0.4	0.25	0.75	(a)	
0.40	0.005	0.095	0.25	0.75	(b)	Elution
1.00	0.0	4.0	0.25	0.75	(b)	
1.50	3.6	0.4	0.25	0.75	(a)	Equilibration to recondition the extraction column
2.00	3.6	0.4	0.25	0.75	(a)	
2.01	0.09	0.01	0.25	0.75	(a)	
2.50	0.09	0.01	0.25	0.75	(a)	

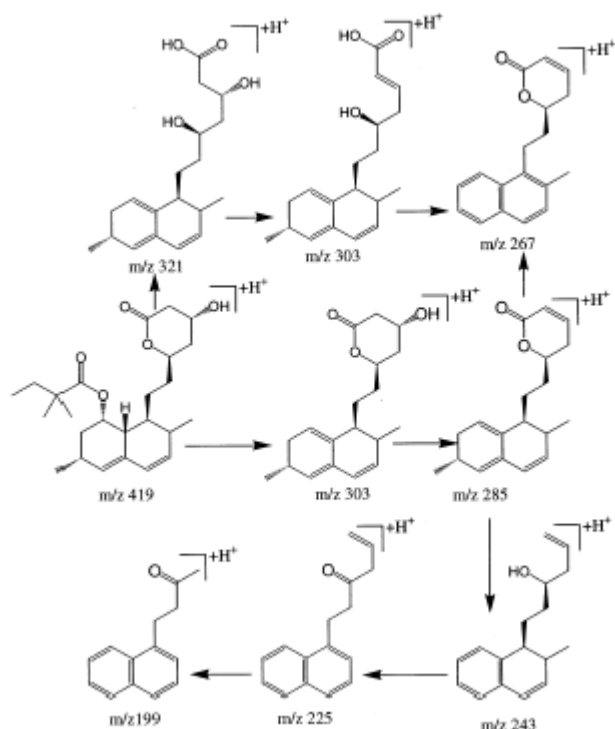
Čerpadla A a C: 3.0 mM kyselina mravenčí ve vodě (mobilní fáze A). Čerpadla B a D: 3.0 mM kyselina mravenčí v acetonitrilu (mobilní fáze B). Ventil byl přepnut v 0.3 a 1.0 min. Rychlost toku mobilní fáze byla snížena v 0.40 a 2.01 min, aby bylo redukováno množství odpadu.

Obr. 26. (19).

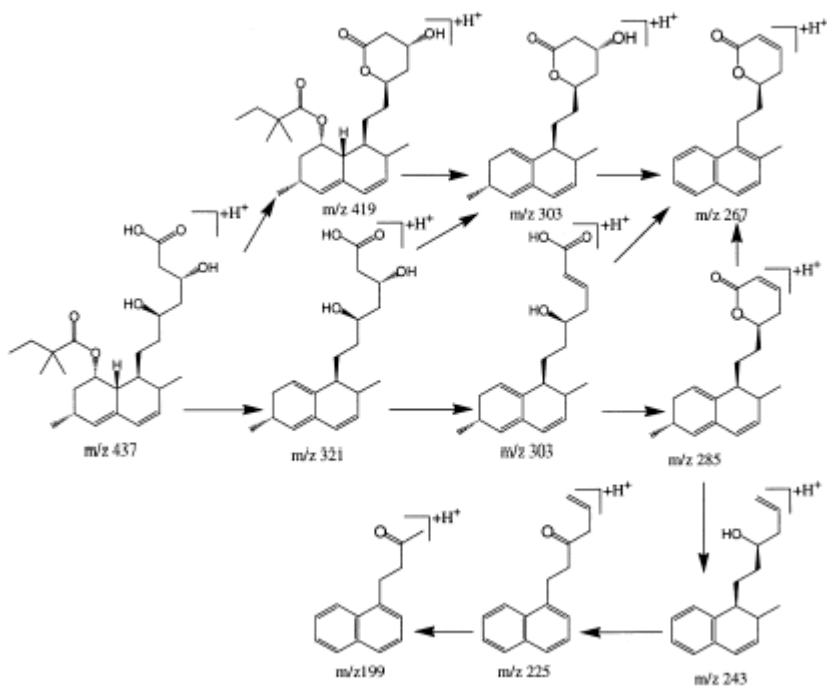
Hmotnostně spektrometrické podmínky.

Hmotnostní spektrometr byl nastaven na pozitivní režim. Detekovány byly přechody prekurzorových iontů $[M+H]^+$ na vybrané produkty. m/z 419 \rightarrow m/z 285 (SV), m/z 437 \rightarrow m/z 303 (SVA), m/z 405 \rightarrow m/z 199 (LV), m/z 423 \rightarrow m/z 285 (LVA).

Předpokládané způsoby disociace prekurzorových iontů SV a SVA na hlavní produkty jsou na obr. 27 a 28.



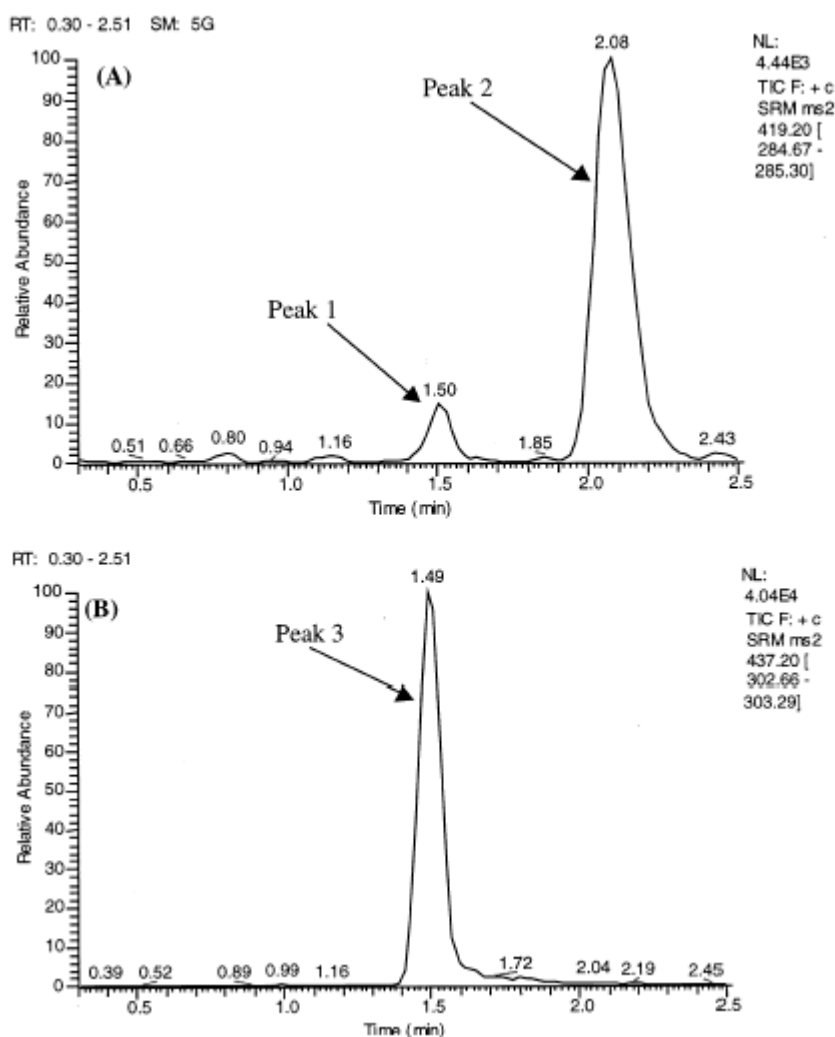
Obr. 27. Srážkou indukovaná disociace $[M+H]^+$ iontu SV (m/z 419) na hlavní produkty (19).



Obr. 28. Srážkou indukovaná disociace $[M+H]^+$ iontu SVA (m/z 437) na hlavní produkty (19).

Srovnáním Q1 spektra SV se spektrem SVA lze nalézt ion m/z 419 protonizovaného SV nejen ve spektru SV, ale také ve spektru SVA. Tento ion pochází z postkolonové in-source

laktionizace SVA. Z toho vyplývá, že SVA může přispívat k m/z 419 \rightarrow m/z 285 SRM přechodu pro stanovení SV, pokud nejsou obě látky chromatograficky rozděleny. Na obr. 29 jsou SRM chromatogramy SV a SVA lidské plasmy obsahující 8 ng/ml SV a 72 ng/ml SVA. Pík 1 na chromatogramu SV je způsoben in-source laktionizací SVA ve vzorku. Stejný problém nastává při stanovení LV a LVA. Tato in-source společná tvorba iontů vyžadující chromatografickou separaci byla popsána pro různé druhy sloučenin. Je třeba si uvědomit, že m/z 419 ion je přítomen nejen v Q1 spektru SVA, ale také ve spektru jejích produktů. Nicméně m/z 419 signál produktu nebude ovlivňovat SRM kanál používaný pro stanovení SV i přes absenci chromatografické separace těchto látek, neboť mezi SRM kanály neexistuje cross-talk.



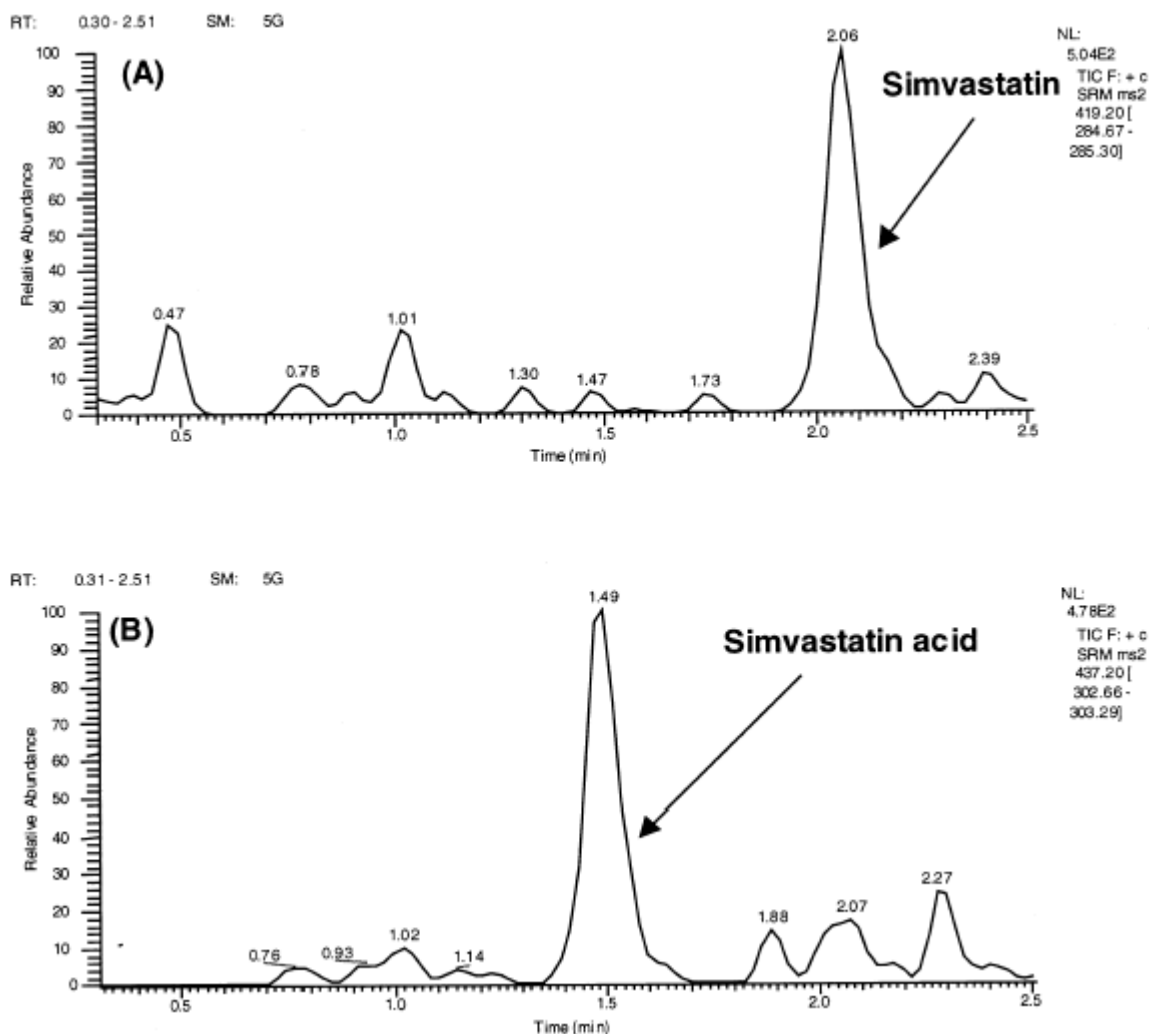
Obr. 29. (A) SRM chromatogram SV (m/z 419 \rightarrow m/z 285 kanál) získaný ze vzorku lidské plasmy obsahující SV a SVA v koncentracích 8 ng/ml a 72 ng/ml. Pík 1 je způsoben in-source laktionizací SVA ve vzorku. Pík 2 pochází ze SV. (B) SRM chromatogram SVA (m/z 437 \rightarrow m/z 303 kanál) získaný z lidské plasmy. Pík 3 pochází ze SVA (19).

V Q1 spektrech analytů a vnitřních standardů byly přítomny také ionty $[M+NH_4]^+$ a $[M+Na]^+$ přestože mobilní fáze neobsahovala známé zdroje amonných či sodných iontů. Odpověď detektoru je ovlivněna nejen složením mobilní fáze (např. octan amonný), ale také teplotou vyhřívané kapiláry. Byly zvoleny takové podmínky, aby byl preferován vznik

$[M+H]^+$ iontů. Je třeba zdůraznit vliv přítomnosti $[M+NH_4]^+$ iontů vedle $[M+H]^+$ iontů v Q1 spektrech analytů SV a SVA, jejichž molekulové hmotnosti se liší pouze o 18 Da (hmotnost vody). $[M+H]^+$ ionty SV a SVA jsou detekovány v m/z 419 a m/z 437. $[M+NH_4]^+$ ionty SV a SVA jsou detekovány v m/z 436 a m/z 454. Tzn., že $[M+NH_4]^+$ ionty SV m/z 436 přispívají (a tudíž interferují) se stanovením SVA se SRM přechodem m/z 437 \rightarrow m/z 303, neboť se liší jen o jednu jednotku. Na tuto možnost interference by měl být brán zřetel, pokud Q1 spektra analytů ve formě laktonů a hydroxykyselin obsahují $[M+NH_4]^+$ i $[M+H]^+$ ionty a pokud jsou $[M+H]^+$ ionty použity jako prekurzory pro stanovení obou analytů.

Úprava vzorku zahrnuje jednoduché odebrání alikvotních vzorků plasmy do vialek autosampleru, přidání roztoku vnitřního standardu, homogenizaci a centrifugaci. Poté jsou vzorky přímo nastříkovány do systému a on-line purifikovány. Podstata tohoto LC-MS-MS systému byla popsána výše.

Typické SRM chromatogramy LOQ vzorků jsou na obr. 30. Metoda je velmi specifická, odpovědi v retenčních časech analytů byly výrazně nižší u blank vzorků ve srovnání s LOQ vzorky. Byl dosažen nejnižší limit stanovení (LOQ) 0.5 ng/ml pro každý analyt.



Obr. 30. SRM chromatogramy lidské plasmy obsahující SV a SVA v koncentracích 0.5 ng/ml a vnitřní standardy LV a LVA v koncentracích 50 ng/ml. (A) kanál SV (m/z 419 \rightarrow m/z 285). (B) kanál SVA (m/z 437 \rightarrow m/z 303) (19).

Závěr.

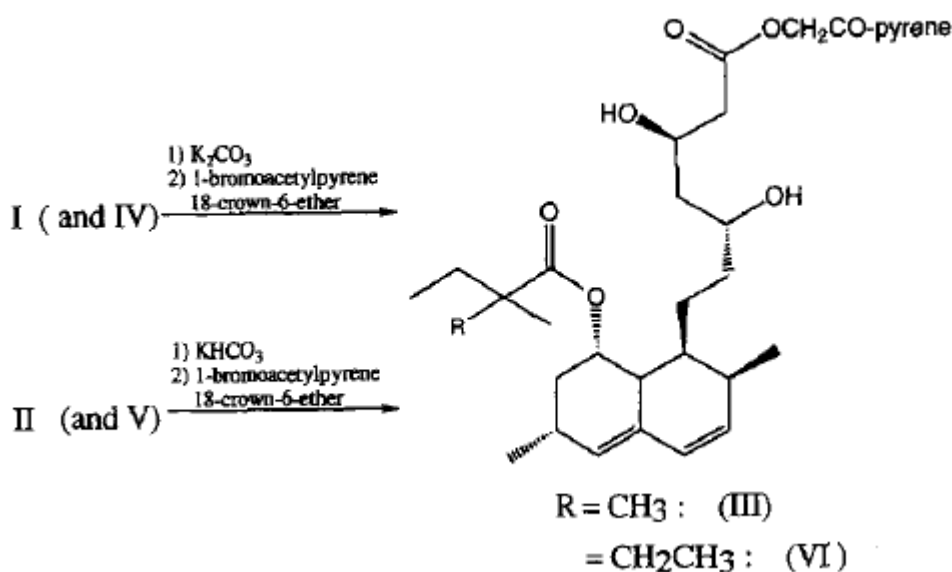
Metoda je přesná, správná, citlivá a specifická. Byla validována za přísných podmínek s použitím několika sad kontrolních vzorků obsahujících rovněž koncentrace SV a SVA nezahrnuté do kalibrační křivky. Zvolením vhodných podmínek (nízká teplota a kyselé pH plasmy) byla snížena ex vivo hydrolýza SV na SVA na $\leq 1.0\%$. Celkový čas analýzy 2.5 min byl dostačující pro chromatografické rozdělení SV od SVA a LV od LVA. (19).

2.6.2.7 Stanovení simvastatinu a jeho aktivního metabolitu v lidské plasmě metodou HPLC technikou přepínání kolon s fluorimetrickou detekcí po derivatizaci 1-bromacetylpyrenem

Hisao Ochiai, Naotaka Uchiyama, Kazuhide Imagaki, Shunsuke Hata, Toshio Kamei (20)

Byla vyvinuta vysoce citlivá a selektivní metoda stanovení simvastatinu (I, β -hydroxy- δ -laktonová forma) a hydrolyzovaného metabolitu (II, β,δ -dihydroxy-kyselá forma molekuly I) v lidské plasmě s použitím derivatizace a techniky přepínání kolon. Vzorke plasmě s vnitřním standardem byly přeneseny na C₈ SPE kolonu. Sloučeniny I a II byly z plasmě extrahovány odděleně do dvou frakcí. Sloučenina I v jedné z frakcí byla hydrolyzována na II. Sloučenina II v obou frakcích byla převedena esterifikací s 1-bromacetylpyrenem v přítomnosti molekuly crownetheru na fluoreskující derivát. Takto získaný pyrenacylester sloučeniny II byl přečištěn na koloně s pevnou fází tvořenou kyselinou fenylboritou (PBA) a stanoven metodou HPLC s přepínáním kolon a fluorimetrickou detekcí. Kalibrační křivky pro obě sloučeniny byly lineární v koncentračním rozmezí 0.1-10 ng/ml. Limit stanovení (LOQ) obou analytů byl 0.1 ng/ml. Tato zkušební metoda je dostatečně citlivá a selektivní pro měření koncentrací sloučenin I a II v plasmě při klinických studiích.

Absorpce UV záření sloučeninami I a II není dostatečná pro jejich detekci v plasmě, proto musí být do jejich molekuly včleněn chromofor. Pomocí této derivatizace je HPLC metoda dostatečně citlivá a selektivní pro stanovení I a II. Fluorescenční derivát vznikl reakcí karboxylové skupiny s 1-bromacetylpyrenem. Za účelem popsání farmakokinetiky I a II je vyžadován limit stanovení (LOQ) 0.1 ng/ml. K dosažení takového LOQ je nutná účinná metoda čištění vzorku. Sloučeniny I a II byly odděleny na C₈ SPE koloně a obě frakce byly převedeny na sůl karboxylové kyseliny. Pyrenacylester sloučeniny II (III, obr. 31) byl připraven pomocí 1-bromacetylpyrenu v přítomnosti molekuly 18-crown-6-etheru. Aby byly deriváty důkladně izolovány od interferujících látek, byla provedena purifikace na SPE koloně tvořené kyselinou fenylboritou (PBA) a stanovení HPLC metodou s technikou přepínání kolon.



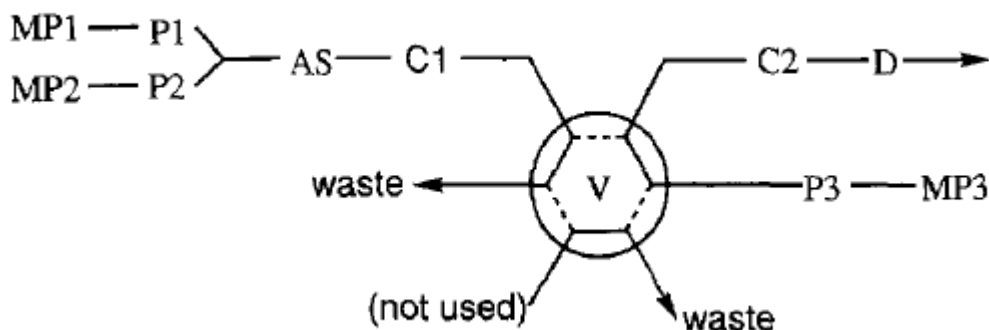
Obr. 31. Derivatizace na fluorescenční produkt (20).

Příprava vzorku.

Vzorky plasmy byly uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analýzy. Po přidavku vnitřního standardu k 1 ml plasmy byl vzorek přenesen na SPE C_8 kolonu aktivovanou methanolem a vodou. Kolona byla promyta směsí acetonitrilu a vody (1:9, v/v) a poté směsí methanolu a vody (3:7, v/v). Sloučeniny II a V byly eluovány směsí methanol-voda (6:4, v/v; kyselá frakce). Sloučeniny I a IV byly poté eluovány acetonitrem (laktonová frakce). K frakci obsahující I a IV byl přidán uhličitan draselný (20 mM, 0.1 ml). Ke kyselé frakci obsahující II a V byl přidán hydrogenuhličitan draselný (20 mM, 0.1 ml). Frakce byly odpařeny do sucha a vysušeny v atmosféře vakua po 30 min. Laktonové formy byly hydrolyzovány na odpovídající draselné soli kyselin. Poté byly obě frakce zvlášť upraveny stejným způsobem: byl přidán roztok 1-bromacetylpyrenu v DMF (N,N-dimethylformamid) a roztok 18-crownu-6 v DMF. Po zreagování složek byl přidán triethylamin-acetonitril (1:9, v/v), aby byly deriváty účinně zachyceny na PBA SPE koloně. Roztok byl přenesen na PBA SPE kolonu a po promytí methanolem a acetonitrem byly deriváty eluovány směsí propylenglykolu a acetonitrilu (4:6, v/v). Eluát byl zředěn vodou a přenesen na C_{18} SPE kolonu aktivovanou acetonitrem a vodou. Po promytí kolony směsí acetonitril-voda (7:3, v/v) byly deriváty eluovány acetonitrem. Eluát byl zakoncentrován a odparek rozpuštěn ve směsí acetonitril-voda (7:3, v/v).

HPLC systém.

Na obr. 32 je schematické znázornění systému přepínání kolon. Separace se uskutečnila na dvou různých kolonách. Vzorek byl aplikován na Varian Bondesil CH analytickou kolonu ($150 \times 4.6\text{ mm I.D.}$, velikost částic $5\text{ }\mu\text{m}$) a promyt mobilní fází obsahující methanol a vodu (80:20, v/v). Mezi 12.5 a 17.5 min byl tok mobilní fáze nasměrován na analytickou kolonu Capcell Pak C_{18} (UG120, $150 \times 4.6\text{ mm I.D.}$, velikost částic $5\text{ }\mu\text{m}$, Shiseido, Tokyo, Japonsko) přepnutím ventilu. Tím byla přenesena hlavní frakce obsahující analyt (III) a vnitřní standard (VI). Poté byl ventil přepnut zpět do původní polohy a separace derivátů byla dokončena na analytické koloně s použitím mobilní fáze obsahující acetonitril a vodu v poměru 80:20, v/v. Mezitím byla předkolona promývána methanolem po dobu 10 min, aby byly odstraněny pozdě se eluující součásti, a poté ustalována za původních podmínek 6 min. Teplota kolony byla udržována na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Fluorimetrický detektor byl nastaven na excitační vlnovou délku 360 nm a emisní vlnovou délku 430 nm. Celkový čas analýzy byl 35 min.



Obr. 32. Schematické znázornění HPLC systému s přepínáním kolon:

MP – mobilní fáze, P1-3 – čerpadlo, AS – autosampler, V – přepínací ventil, C1 – Bondesil CH kolona, C2 – Capcell pak C_{18} kolona, D – fluorimetrický detektor (20).

Derivatizace.

Byla použita derivatizace na fluorescenční produkty, neboť intenzita absorpce molekul I a II je nízká. 1-bromacetylpyren je často používán při derivatizaci karboxylových kyselin; obsahuje pyrenový chromofor mající vysokou intenzitu fluorescence. Reakcí draselné soli II s 1-bromacetylpyrenem v přítomnosti katalyzátoru 18-crown-6 vznikne produkt III. Fluorescenční spektrum tohoto produktu má maximální excitační vlnovou délku při 360 nm a emisní vlnovou délku 430 nm. Pro dosažení optimálních podmínek derivatizace byly testovány různé podmínky. Reakce probíhala dostatečně rychle i při pokojové teplotě. Maximální koncentrace produktu bylo dosaženo za 30 min. Jako rozpouštědlo byl zvolen DMF, neboť při použití jiných rozpouštědel (acetonitril, tetrahydrofuran, aceton) byl získán nižší výtěžek. Také byl hodnocen vliv koncentrace 1-bromacetylpyrenu a 18-crown-6 na výtěžek reakce. Koncentrace těchto látek rovné a vyšší než 10 mM poskytly dobré výsledky. Derivát v konečné reakční směsi byl stabilní nejméně po 2 h při pokojové teplotě.

Čištění vzorku na SPE koloně tvořené PBA pevnou fází.

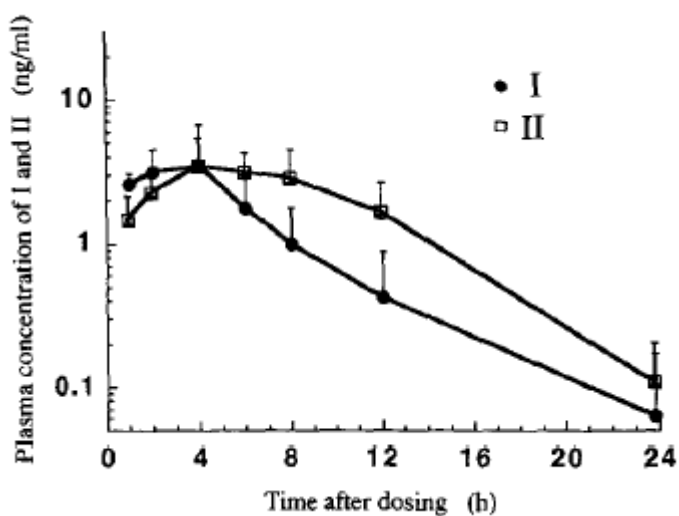
Blízko píku látky III bylo eluováno mnoho interferujících složek. Tyto složky byly považovány za výsledné produkty reakce endogenních karboxylátů s 1-bromacetylpyrenem. Pokusy odstranit tyto interference běžnou extrakcí na pevnou fázi před HPLC analýzou nebyly úspěšné. Kyselina fenylboritá (PBA) je schopna tvořit cyklické sloučeniny typu 1,3-diolů. Po přenesení reakční směsi na SPE kolonu tvořenou PBA byl přebytečný 1-bromacetylpyren a látky, které nemohou tvořit cyklické boritany, selektivně vymyty methanolem a acetonitrilem. Při promývání byly deriváty mající 1,3-diolovou část zachycovány na pevné fázi. Poté byly tyto deriváty eluovány směsí propylenglykolu a acetonitrilu (40/60, v/v). Propylenglykol byl použit proto, aby nedocházelo k hydrolyze esterové části molekul. Propylenglykol štěpí cyklické vazby mezi kyselinou fenylboritou tvořící pevnou fázi v koloně a sloučeninou III. Protože eluát je obtížně odpařitelný vzhledem k vysoké teplotě varu propylenglykolu (187 °C), byla použita SPE C₁₈ kolona k jeho odstranění.

Metoda HPLC s technikou přepínání kolon.

Bylo testováno několik analytických kolon jako C₁₈, PH, CH a CN v kombinaci s mobilními fázemi methanol-voda nebo acetonitril-voda. Kombinace C₁₈ kolony s mobilní fází acetonitril-voda poskytla ostrý pík látky III, ale nebyla dosažena kompletní separace od interferujících látek. Na druhé straně, použití CH kolony a mobilní fáze methanol-voda umožnilo složky účinně oddělit, ale pík III nebyl ostrý. Aby byly využity výhody obou separačních systémů, byly zkombinovány pomocí techniky přepínání kolon. Tok mobilní fáze obsahující deriváty analytů a vnitřních standardů byl nasměrován z CH kolony na C₁₈ kolonu. V důsledku byla III kompletně oddělena od endogenních látek a poskytla ostrý pík.

Aplikace metody.

Metoda byla aplikována při stanovení hladin I a II v lidské plasmě po perorálním podání. Průměrné plasmatické koncentrace I a II po jednorázové perorální dávce 20 mg I u tří dobrovolníků jsou znázorněny na obr. 33. Průměrné C_{max} I a II dosáhly hodnot 4.14 a 4.11 ng/ml.



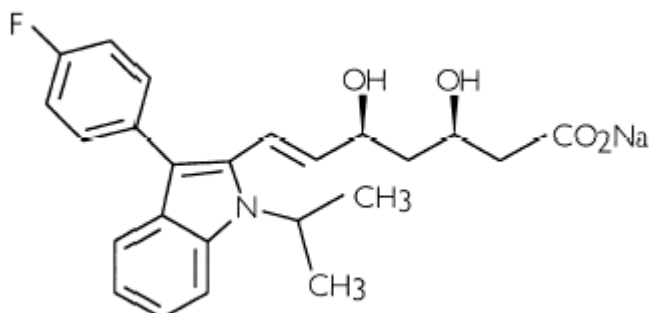
Obr.33. Plasmatické koncentrace I (simvastatinu) a II (simvastatin hydroxykyseliny) po perorálním podání 20 mg I u tří zdravých dobrovolníků (20).

Závěr.

Metoda HPLC stanovení I a II v lidské plasmě je selektivní a vysoce citlivá. Využívá techniky přepínání kolon, derivatizaci 1-bromacetylpyrenem a fluorimetrickou detekci produktu. Použití pevné fáze tvořené PBA v procesu čištění vzorku významně eliminovalo množství interferujících látek endogenního materiálu. Následná HPLC separace s technikou přepínání kolon umožnila detekci pyrenacetylestereů analytů. Byl dosažen limit stanovení 0.1 ng/ml pro oba analyty (20).

2.6.3 Fluvastatin

[*R**,*S**-(*E*)-](±)-7-[3-(4-fluorofenyl)-1-(methylethyl)-1*H*-indol-2yl]-3,5-dihydroxy-6-heptenová kyselina, sodná sůl.



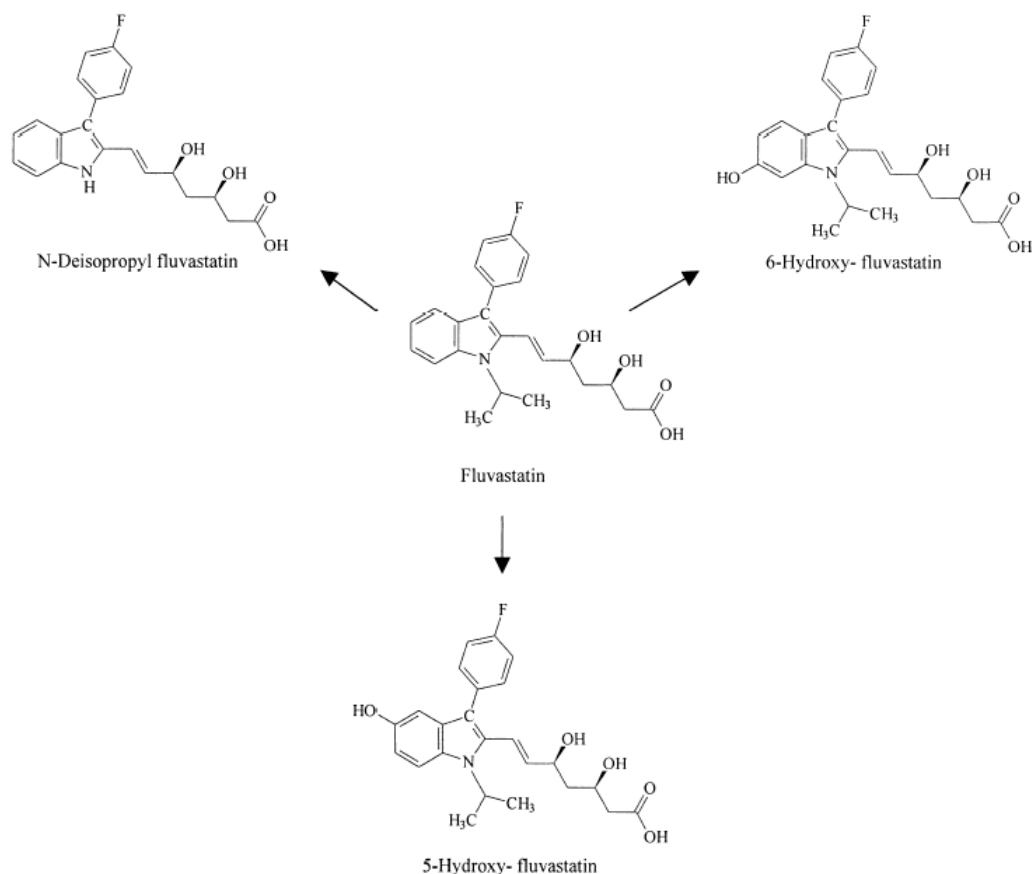
2.6.3.1 Klinická farmakokinetika

Fluvastatin je sodná sůl [*R**,*S**-(*E*)-](±)-7-[3(4-fluorofenyl)-1-(methylethyl)-1*H*-indol-2yl]-3,5-dihydroxy-6-methyl-6-heptanové kyseliny. Asymetrické uhlíky v polohách 3 a 5 postranního řetězce heptanové kyseliny poskytují 2 možné diastereoizomery, tj. erythro a threo formu. Lékové formulace obsahují erythro-formu složenou z racemické směsi dvou stereoisomerů (+)-3*R*,5*S* a (-)-3*S*,5*R*, nicméně *inhibiční aktivita je 30 krát vyšší u (+)-3R,5S enantiomeru*. Výsledky studií potvrdily, že vychytávání enantiomerů fluvastatinu do cílových tkání (játra) může být stereoselektivní. Okolo 90% perorální dávky fluvastatinu (FV) je ze střeva absorbováno, ale biodostupnost je nízká (19% při podání 2 mg a 29% při podání 10 mg) vzhledem k presystémové eliminaci. Závislost biodostupnosti na dávce lze vysvětlit saturační kinetikou prvního průchodu játry (22) Na rozdíl od ostatních statinů je jeho absorpce snížena s jídlem, zvláště tučným. Na farmakologický účinek však nemá tento fakt významný vliv (29).

Vazba enantiomerů FV na plasmatické proteiny je vyšší než 99%, distribuční objem FV u zdravých jedinců je 0.42 l/kg a eliminační poločas 0.7-1.0 h (22).

Eliminace FV je výhradně závislá na metabolismu, hlavním degradačním enzymem je CYP2C9 (22). Díky této isoformě metabolizujícího enzymu má fluvastatin nízký interakční potenciál; nejvýznamnější je léková interakce s diklofenakem. Pro tyto výhodné vlastnosti si fluvastatin udržuje své místo v terapii u dialyzovaných pacientů (29).

FV je hydroxylován na indolovém kruhu v polohách 5 a 6 a/nebo je odštěpena isopropylová skupina (obr. 34). Převažujícím metabolitem v plasmě je *N*-desisopropylpropionát, který je inaktivní. 5-hydroxy a 6-hydroxy FV mají inhibiční aktivitu, ale jejich koncentrace v plasmě jsou extrémně nízké (22).



Obr. 34. *Metabolismus fluvastatinu u člověka (22).*

2.6.3.2 Přehled analytických metod

Metody stanovení fluvastatinu v biologickém materiálu spočívají převážně na HPLC separaci a fluorimetrické detekci: *Kalafsky et al. (25)*; *Toreson a Eriksson (24)*; *Lanchote et al. (22)*; *Al-Rawithi et al. (26)*. Toreson a Eriksson provedli *stereoselektivní analýzu* fluvastatinu v lidské plasmě po extrakci do kapaliny. Separace proběhla na stacionární chirální fázi kolony Chiralcel OD-R [tris(3,5-dimethylfenyl)karbamát celulosy na silikagelu]. Lanchote et al. vyvinuli analytickou metodu stanovení enantiomerů fluvastatinu v lidské plasmě aplikovatelnou na kinetické studie sledující dostupnost léčiva podávaného v racemické formě (22). Pouze jedna metoda je založena na HPLC separaci s UV detekcí: *Nakashima et al. (23)*. *Leis et al. (21)* stanovili fluvastatin metodou GC, která využívá výhod detekce hmotnostní spektrometrie v kombinaci s včleněním stabilního isotopu, a tudíž je vysoce citlivá a specifická (21). V lékových formách je fluvastatin také stanovován kapilární elektroforézou: *Dokrukol-Ak D et al. (41)*.

2.6.3.3 Kvantitativní stanovení fluvastatinu v lidské plasmě metodou GC/NICI-MS s použitím vnitřního standardu [¹⁸O₂]-fluvastatinu

Hans Jörg Leis, Werner Windischhofer (21)

Představovaná metoda stanovení fluvastatinu v lidské plasmě je citlivá a specifická. Léčivo bylo izolováno z plasmy extraktivní alkylací pentafluorobenzylbromidem (PFBBBr) a poté derivatizováno na bis(trimethylsilyl)derivát. [¹⁸O₂]-Fluvastatin byl připraven z neznačeného fluvastatinu a použit jako vnitřní standard. Plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie za podmínek chemické ionizace a detekce negativních iontů byla použita pro měření iontových spekter (*m/z* 554.26 a 558.26 pro analyt a vnitřní standard). Kalibrační křivka byla lineární v rozmezí 2 - 512 ng/ml plasmy. Isotopem značený standard vykazoval za analytických podmínek stabilitu.

Cílem této metody tedy bylo vyvinout citlivou metodu stanovení fluvastatinu v lidské plasmě založené na plynové chromatografii (GC)/MS a navíc vypracovat strategii pro stabilní značení fluvastatinu.

Extraktivní alkylace a silylace.

Acetonitrilový roztok (50 µl) obsahující 53 ng vnitřního standardu byl odpipetován do zkumavky s 0.5 ml plasmy. Po krátkém protřepání bylo přidáno 50 µl NaOH 3 M a 250 µl roztoku hydrogensíranu tetrabutylamonného (TBAHSO₄; 0.1 M ve vodě). Poté bylo přidáno 1.5 ml roztoku PFBBBr (0.25% v toluenu/ethylacetátu, 1:1, v/v) a směs intenzivně míchána 10 min. Po centrifugaci byla organická vrstva přemístěna do čisté zkumavky a rozpouštědlo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v 70 µl MSTFA (N-methyl-N-/trimethylsilyl/trifluoroacetamidu) v pyridinu (2:1, v/v, obsahující 1% trimethylchlorosilanu), vzorek homogenizován a přenesen do autosampleru. Vialky byly uzavřeny a skladovány při -20°C.

Plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie.

Byl použit plynový chromatograf Finnigan TRACE 8000 spojený s hmotnostním spektrometrem Finnigan TRACE (ThermoQuest, Vídeň). Chromatograf obsahoval kapilární kolonu BPX5 (15 m × 0.25 mm i.d., SGE). Injektor byl udržován na teplotě 280°C. Jako nosný plyn bylo použito helium s konstantní průtokovou rychlostí 1.5 ml/min. Teplota v první minutě 180°C byla postupně zvyšována stálou rychlostí na 310°C a udržována po 2 h. NICI (negative ion chemical ionization) byla provedena při elektronové energii 70 eV a výstupním proudem 0.250 A.

Validace analytické metody.

Kalibrační křivka byla připravena změřením vzorků blank plasmy obsahující náležité množství methanolického roztoku fluvastatinu s výslednou koncentrací 2 - 512 ng/ml.

Extraktivní alkylace a silylace.

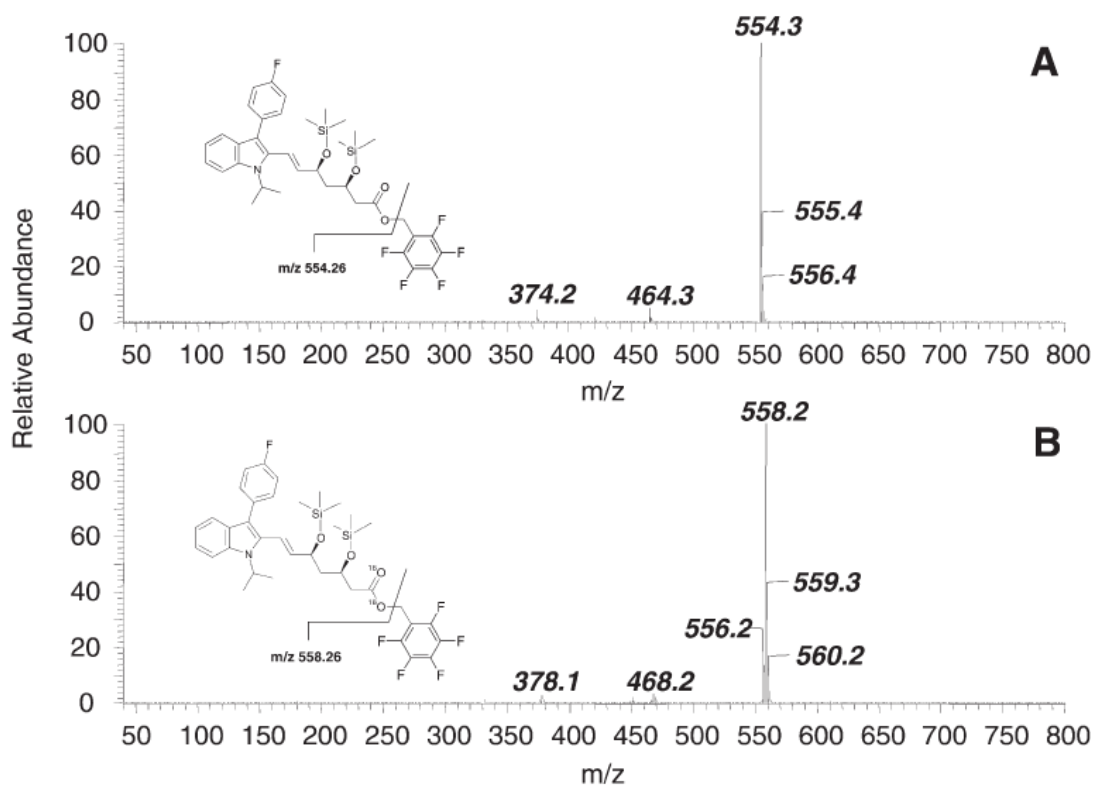
Extrakce amfoterních sloučenin nesoucích zásadité a kyselé funkční skupiny z vodného prostředí může být složitá, neboť karboxylové skupiny vyžadují kyselé prostředí, které není příznivé např. pro aminoskupiny. Reakce s TBAHSO₄ umožnila extrakci do organické fáze

při alkalickém pH. Fluvastatin dále reagoval s PFBBBr po dobu 10 min. Derivatizace s PFBBBr neovlivnila intenzitu signálu a následující silylace neměla za následek vznik per-TMS derivátu (kompletně trimethylsilylovaného derivátu), jak se předpokládalo u metody EI-GC/MS, kde byla naznačena kompletní přeměna na ester PFB. Trimethylsilylace byla kvantitativní, a prodloužený reakční čas ani zvýšená teplota nezpůsobily zvýšení intenzity signálu. Proto tento postup poskytuje účinný způsob současné extrakce a derivatizace analytu z lidské plasmy za mírných podmínek. Kromě toho je alkalické prostředí příznivé co se týče možné zpětné konverze ^{18}O -značeného vnitřního standardu. Po derivatizaci na PFB ester je isotopové značení zablokováno a mohou být voleny další podmínky analýzy podle potřeby.

Plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie.

PFB estery poskytují specifické odpovědi za NCI-MS podmínek. Tvorba resonančně stabilizovaného karboxylátového aniontu po záchytu elektronu je upřednostněna, přičemž tyto karboxylátové ionty vznikají v mimořádně velkém počtu. PFB ester TMS etherový derivát fluvastatinu vykazuje podle očekávání NCI hmotnostní spektrum s omezenou fragmentací, kde dominuje karboxylátový ion m/z 554. Tato vlastnost je výhodná pro kvantitativní stanovení díky vysoké citlivosti. Jediné fragmentární ionty vyskytující se s malou intenzitou vznikly ztrátou neutrálního trimethylsilanolu vedoucí k m/z 464 a 374. Podle očekávání byly m/z hodnoty [$^{18}\text{O}_2$]-fluvastatinu posunuty o 4 amu (obr. 35).

I přes komplexní matici, ve které se léčivo nacházelo, vykazoval vybraný derivát fluvastatinu vynikající chování během GC analýzy, píky byly symetrické. Derivát fluvastatinu byl eluován v 5.57 min. Celkový čas analýzy jednoho vzorku byl 10 min (chlazení, ustalování rovnováhy). Pík v retenčním čase fluvastatinu při nástřiku blank plasmy pocházel z neznačených součástí vnitřního standardu a odpovídal koncentraci 0.6 ng ml^{-1} .



Obr. 35. NICI hmotnostní spektra nativního (A) a [$^{18}\text{O}_2$] značeného (B) fluvastatinu po derivatizaci na pentafluorobenzylester-bis(trimethylsilyl)ether (21).

Validace analytické metody.

Kalibrační křivky byly lineární v rozmezí koncentrací 2 až 512 ng ml⁻¹ plasmy s použitím 53 ng vnitřního standardu; korelační koeficient měl hodnotu 0.9992-1.0000 (n = 5). Detekční limit hmotnostního spektrometru byl 1 pg při poměru signálu k šumu 4:1. Pro rutinní měření byl LOQ nastaven na 2 ng ml⁻¹ plasmy vzhledem k potřebám farmakokinetických studií, ale limit detekce pod 1 ng ml⁻¹ je snadno dosažitelný.

Závěr.

Metoda poskytuje přesné a správné výsledky především díky omezené fragmentaci za NCI podmínkách a charakteristickým vlastnostem PFB esteru (záchyt elektronu) v kombinaci se stabilně značeným vnitřním standardem.

V porovnání s metodami s fluorimetrickou detekcí, použití stabilně značeného vnitřního standardu zvyšuje specifčnost a citlivost MS detekce, čímž jsou kompenzovány ztráty při zpracování vzorku a derivatizaci. LOQ 2 ng ml⁻¹ je srovnatelný s výsledky jiných metod stanovení fluvastatinu. Vzhledem k nízkému limitu detekce použité metody může být dosažen LOQ nižší než 1 ng ml⁻¹ (21).

2.6.3.4 Stereoselektivní analýza fluvastatinu v lidské plasmě pro účely farmakokinetické studie

Vera Lucia Lanchote , Adriana Rocha , Flavio Ulliana Vieira de Albuquerque , Eduardo Barbosa Coelho , Pierina Sueli Bonato (22)

Fluvastatin je dostupný jako racemická směs (+)-3*R*,5*S* a (-)-3*S*,5*R* stereoisomerů, přestože inhibiční aktivita je převážně dána (+)-3*R*,5*S* isomerem. Cílem této studie bylo stanovit hladiny isomerů fluvastatinu v lidské plasmě. Vzorokly plasmy byly eluovány na koloně LC₁₈ Supelclean (Supelco). Kolona byla promyta vodou a acetonitrilem, poté byly analyty eluovány methanolem obsahujícím 0.2% diethylamin. (+)-3*R*,5*S* a (-)-3*S*,5*R* isomery byly odděleny na koloně Chiralcel OD-H s chirální fází a detekovány fluorimetricky (λ_{ex} 305 nm; λ_{em} 390 nm). Limit stanovení byl 0.75 ng pro oba isomery/ml plasmy; odezva detektoru byla lineární do koncentrace 625 ng/ml. Hodnota relativní standardní odchylky byla nižší než 10% a výtěžnost vyšší než 80% pro oba enantiomery. Aplikace metody na stereoselektivní studii farmakokinetiky fluvastatinu po jednorázovém perorálním podání (Lescol, 20 mg) potvrdila stereoselektivitu. V plasmě byly nalezeny vyšší hladiny (-)-3*S*,5*R* isomeru (C_{max} 92.4 vs. 60.3 ng/ml, AUC^{0-∞} 133.3 vs. 97.4 ng h/ml, Cl/f 150.2 vs. 205.2 l/h a V_d/f 4.4 vs. 6.0 l/kg) oproti (+)-3*R*,5*S* isomeru.

Přístrojové vybavení.

Pro extrakci byly použity LC₁₈ Supelclean kolony (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a SPE extraktory Aspec XL (Gilson Medical Electronics, Villiers-le Bel, Francie). Chromatografický systém tvořil chromatograf Shimadzu (Kyoto, Japonsko) vybavený LC-10 AS čerpadlem a FR 551 fluorimetrickým detektorem pracujícím při excitační vlnové délce 305 nm a emisní vlnové délce 390 nm.

Extrakce na pevnou fázi a chirální separace.

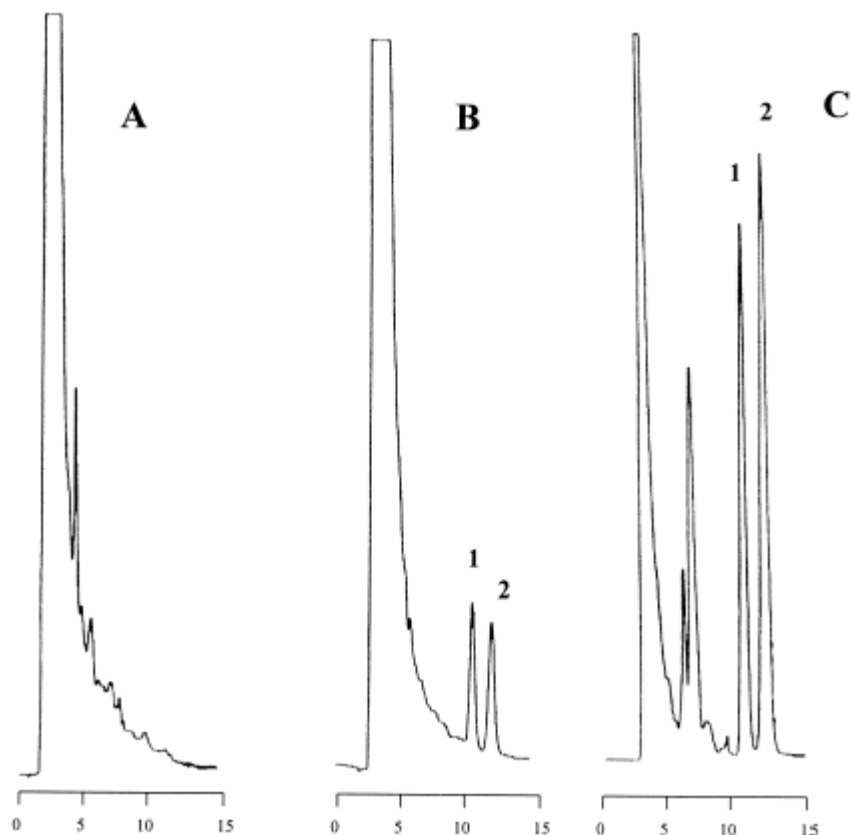
LC₁₈ extrakční kolona byla aktivována methanolem a poté stejným množstvím vody. Po centrifugaci byly vzorky dávkovány na kolonu a promyty postupně vodou a acetonitrilem. Fluvastatin byl eluován 0.2% roztokem diethylaminu v methanolu. Alikvotní podíly byly odpařeny do sucha a odparky rozpuštěny ve směsi hexan-ethanol (9:1, v/v). Separace enantiomerů byla provedena na koloně Chiralcel OD-H 150 × 4.6 mm (Chiral Technologies, Exton, PA, USA). Mobilní fáze byla tvořena směsí hexan-ethanol (9:1, v/v) obsahující 0.2% kyselinu trifluoroctovou. Příprava vzorku a separace byla provedena pod zdrojem žlutého SVětla.

Výsledky.

Enantioselektivní studie farmakokinetiky léčiv vyžaduje analytickou metodu umožňující rozlišit chirální formy a mající zároveň limity stanovení kompatibilní s nízkými plasmatickými koncentracemi těchto enantiomerů.

Enantiomery plasmatického fluvastatinu byly přímo odděleny na koloně Chiralcel OD-H (obr. 36). Pořadí, ve kterém byly enantiomery eluovány, tedy (-)-(3*S*,5*R*) a (+)-(3*R*,5*S*), bylo odvozeno ze studie autorů Toreson a Eriksson (24). Frakce eluované z Chiralcel OD-H kolony byly odděleně vloženy na kolonu Chiralcel OD-R (mobilní fáze obsahovala acetonitril-0.1 M fosfátový pufr o pH 3, 40:60, v/v). Na této koloně byly eluovány v pořadí (-)-(3*S*,5*R*) a (+)-(3*R*,5*S*) s retenčními časy 29.7 a 31.4 min. Na koloně Chiralcel OD-H byly

analyty stanoveny s retenčními časy 10 a 12 min. Při analýze blank plasmy nebyly detekovány látky interferující se stanovením fluvastatinu.



Obr. 36. Chromatogram (A) vzorku blank plasmy (B) vzorku plasmy obsahující racemický fluvastatin v koncentraci 50 ng/ml (C) vzorku plasmy 1.5 h po podání racemického fluvastatinu; pík 1 (-)-(3S,5R) fluvastatin, pík 2 (+)-(3R,5S) fluvastatin (22).

Výtěžnost po extrakci na C₁₈ SPE cartridge a eluci methanolem s obsahem 0.2% diethylaminu byla vyšší než 80%. Podobných výsledků dosáhli Toreson a Eriksson (24) s použitím LLE do methyl-*tert*-butyletheru při pH 6.5 po precipitaci proteinů acetonitrilem. Toreson a Eriksson (24) popsali extrakci fluvastatinu na C₂ cartridge on-line spojenou s analytickou kolonou s výtěžností 90%.

Limit stanovení 0.75 ng/ml pro oba enantiomery umožňuje aplikaci metody na farmakokinetické studie biodostupnosti po jednorázovém podání. Metodu lze považovat za vysoce selektivní vzhledem k použití techniky SPE a fluorimetrické detekce umožňující stanovení fluvastatinu v kombinaci s jinými léčivými. Studie potvrzuje, že neexistují interference mezi fluvastatinem a jinými současně podávanými léčivými, jako analgetika-antipyretika, NSAID, antihypertenziva, antiarytmika, antimikrobiální látky, látky působící na centrální nervový systém, antiasthmatika (viz Tab. 5). Mezi další výhody patří automatizace metody s následným zkrácením doby analýzy na 13 min.

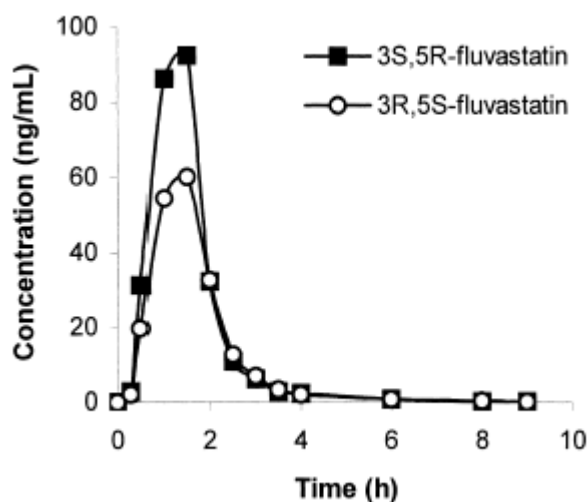
Tab. 5. (22).

Selectivity study: analysis of fluvastatin enantiomers in plasma

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Retention time (min)
(-)-(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-Fluvastatin	25.0	10.15
(+)-(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-Fluvastatin	25.0	12.38
Benzydamine	25.0	30.93
Clomipramine	25.0	8.7
Metoclopramide	25.0	25.31
Propranolol	25.0	7.30 and 33.85
Quinidine	25.0	6.21

Not detected during the 0–60 min interval: acetaminophen, aminopyrine, amiodarone, atenolol, captopril, carbamazepine, clobazam, chlorpromazine, dapsone, digoxin, etidocaine, phenacetin, lidocaine, nitrazepam, propafenone, sotalol, theophylline, trimipramine, verapamil.

Metoda byla použita v enantioselektivní studii biodostupnosti fluvastatinu podaném dobrovolníkovi jednorázově p.o. v racemické formě v dávce 20 mg. Farmakokinetické parametry jsou shodné s údaji v literatuře. (-)-(3*S*,5*R*) enantiomer vykazoval vyšší hodnoty C_{max} a $\text{AUC}^{0-\infty}$ a nižší hodnoty celkové clearance (obr.37). Poměr plasmatických koncentrací $\text{AUC}^{0-\infty}$ (-)-(3*S*,5*R*)/ $\text{AUC}^{0-\infty}$ (+)-(3*R*,5*S*) byl 1.4 ve prospěch (-)-(3*S*,5*R*), kterému je přisuzována nižší inhibiční aktivita.



Obr. 37. Plasmatické koncentrace enantiomerů fluvastatinu po p.o. podání 20 mg racemátu (22).

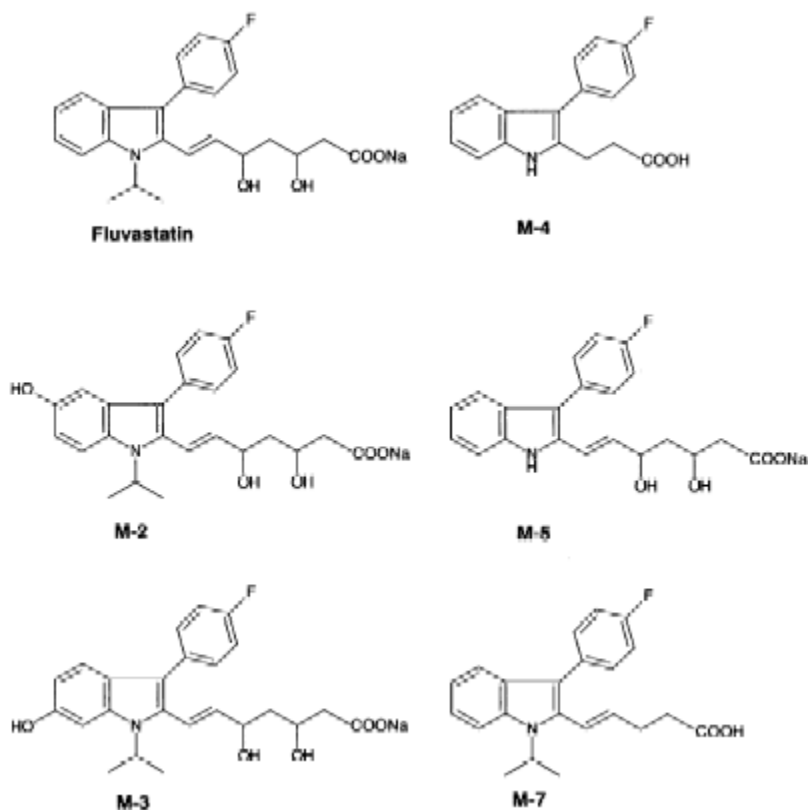
Závěr.

Metoda je jednoduchá, rychlá a reprodukovatelná. Limit stanovení pro oba enantiomery 0.75 ng/ml umožňuje aplikaci metody v klinických studiích (22).

2.6.3.5 Stanovení fluvastatinu a jeho pěti metabolitů v lidské plasmě s použitím gradientové RP-HPLC metody s UV detekcí

Akinori Nakashima , Christoph Saxer , Miyuki Niina , Naoki Masuda , Kazuhide Iwasaki , Kotaro Furukawa (23)

Byla validována jednoduchá RP-HPLC metoda stanovení fluvastatinu (FV) a pěti metabolitů (obr. 38), (M-2, M-3, M-4, M-5 a M-7) v lidské plasmě dosahující limitu stanovení 10 ng/ml. Ze stabilitních studií vyplynulo, že FV a metabolity jsou stabilní v lidské plasmě nejméně jeden měsíc při skladovací teplotě – 30 °C.

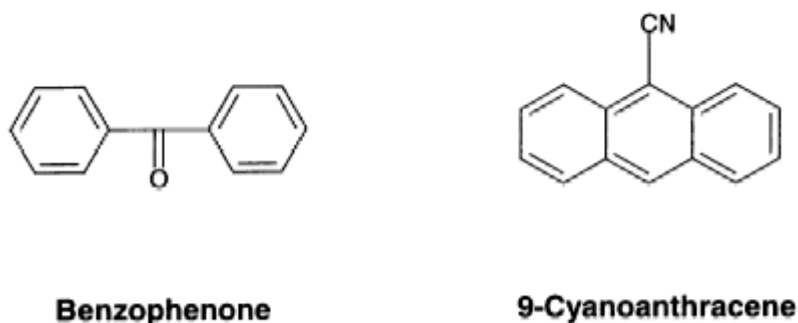


Obr. 38. Chemické struktury fluvastatinu a metabolitů (23).

V lidské plasmě byly detekovány metabolity 5-hydroxy FV (M-2), 6-hydroxy FV (M-3) a des-isopropylpropionátový derivát FV (M-4), deriváty M-2, M-3 a M-5 převažovaly ve stolici. Podle in vitro studií je FV metabolizován mikrosomálními enzymy jater na M-2, M-3 a des-isopropyl FV (M-5).

FV a metabolity mají inhibiční efekt na NADPH indukovanou peroxidaci lipidů. Inhibiční efekt M-2, M-3 a M-5 je silnější než efekt samotného FV. M-4 a M-7 také inhibují peroxidaci lipidů, ale méně než FV. FV a metabolity byly analyzovány na dvou chromatografických systémech vzhledem k velkým rozdílům v hydrofilitě stanovovaných molekul. Šest sloučenin bylo rozděleno do dvou skupin. M-2, M-3 a M-5, tedy více hydrofilní sloučeniny, byly analyzovány v systému 1. M-4, M-7 a FV byly stanoveny v systému 2. Metodu lze aplikovat na in vivo a in vitro studie antioxidačních účinků FV a jeho metabolitů.

Jako vnitřní standardy byly použity benzofenon a 9-kyananthracen (obr.39).



Obr. 39. Chemické struktury vnitřních standardů (23).

Chromatografický systém.

Systém 1 (stanovení M-2, M-3 a M-5).

Systém 1 byl tvořen z čerpadla, integrátoru, UV detektoru nastaveného na vlnovou délku 305 nm, L-kolony ODS s reverzní fází (150 × 4.6 mm I.D., 5 μm, Chemicals Evaluation and Research Institute, Fukuoka, Japonsko). Teplota kolony byla udržována na 40 °C. Mobilní fáze A byla tvořena methanolem a mobilní fáze B 0.2% vodným roztokem kyseliny fosforečné. Gradient: 0 min, 55% A; 6 min, 55% A; 14 min, 70% A (lineární gradient od 6 do 14 min); a 14.01 min, 55% A do 20 min (ustálení původních podmínek).

Systém 2 (stanovení M-4, M-7 a FV).

Systém 2 byl tvořen z čerpadla, integrátoru, UV detektoru nastaveného na vlnovou délku 305 nm, L-kolony ODS s reverzní fází (150 × 4.6 mm I.D., 5 μm, Chemicals Evaluation and Research Institute, Fukuoka, Japonsko). Teplota kolony byl udržována na 40 °C. Mobilní fáze A byla tvořena methanolem a mobilní fáze B 0.2% vodným roztokem kyseliny fosforečné. Gradient: 0 min, 60% A; 15 min, 60% A; 20 min, 90% A (lineární gradient od 15 do 20 min); a 20.01 min, 60% A do 25 min (ustálení původních podmínek).

Příprava vzorku.

Systém 1 (stanovení M-2, M-3 a M-5).

K 0.5 ml lidské plasmy bylo přidáno 0.5 ml fosfátového pufru (pH 7) a 0.44 ml methanolu. Po homogenizaci byl vzorek aplikován na Oasis HLB cartridge aktivovanou methanolem a vodou. Po vložení vzorku byla cartridge postupně promyta fosfátovým pufrům (pH 7), směsí fosfátového pufru a methanolu (95:5), směsí fosfátového pufru a methanolu (70:30) a nakonec vodou. Stanovované složky byly eluované methanolem. Po přidavku 5% propylenglykolu v methanolu byl eluát odpařen do sucha dusíkem za pokojové teploty. Odparek byl po přidavku vnitřního standardu (roztok benzofenonu v methanolu) rozpuštěn ve směsi methanol-voda (1:1). Poté byl nastříkovaný do systému 1.

Systém 2 (stanovení M-4, M-7 a FV).

K 0.5 ml lidské plasmy bylo přidáno 0.5 ml fosfátového pufru (pH 7). Po přidavku 5 ml diethyletheru byla směs homogenizována a poté centrifugována při 4 °C. Organická vrstva byla přenesena do zkumavky, vodná vrstva byla znovu extrahována diethyletherem. Organické vrstvy byly spojeny a smíseny s 5% roztokem propylenglykolu v methanolu. Eluát byl odpařen do sucha proudem dusíku za pokojové teploty. Odparek byl po přidavku vnitřního standardu (roztok 9-kyanoanthracenu v methanolu) rozpuštěn v methanolu. Poté byl nastříkovan do systému 2.

Výsledky.

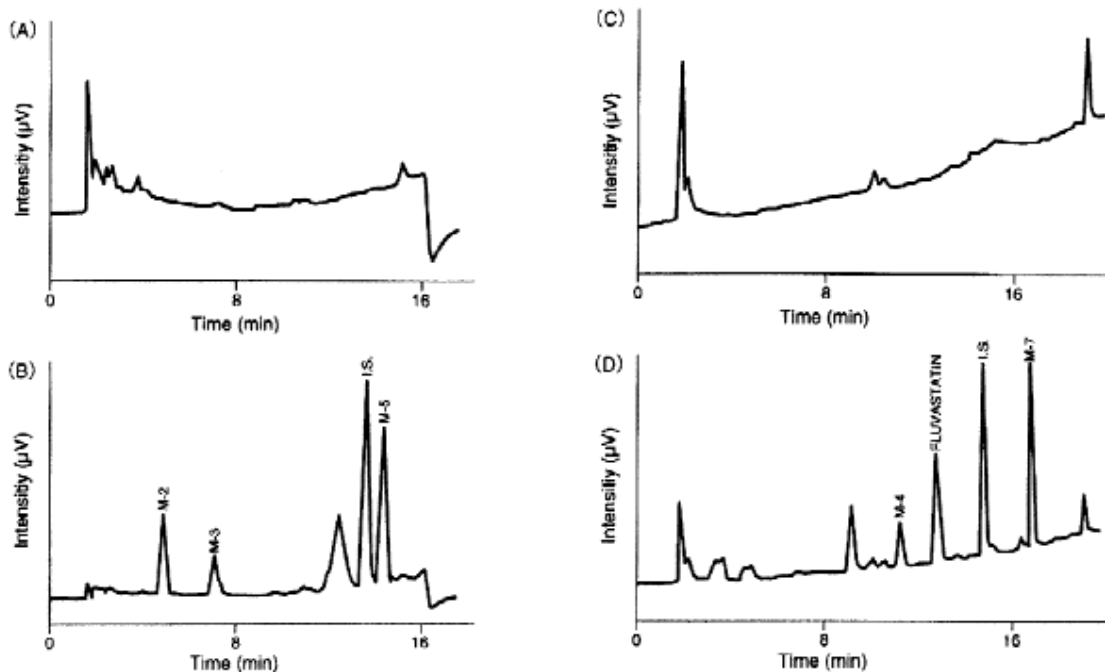
Stanovení FV a metabolitů v jednom chromatografickém systému přesahovalo časový rámec (120-130 min) zkoušky vzhledem k výrazným rozdílům v hydrofilních charakterech sloučenin. Proto byly látky rozděleny do dvou skupin podle hydrofilnosti na systém 1 (M-2, M-3 a M-5) a systém 2 (M-4, M-7 a FV) a stanoveny v kratším čase.

Systém 1 (stanovení M-2, M-3 a M-5).

Po získání UV spekter analytů byla vlnová délka detektoru nastavena na 305 nm. S L-kolonou ODS (150 × 4.6 mm I.D., 5 μm) obsahující volné silanolové skupiny byly získány ostře definované píky (obr. 40 A, B). V retenčních časech M-2, M-3, M-4 a I.S., tedy v 4.7, 7.0, 14.3 a 13.6 min, nebyly nalezeny interferující píky. Celkový čas jednoho cyklu byl 20 min.

Systém 2 (stanovení M-4, M-7 a FV).

Po získání UV spekter analytů byla vlnová délka detektoru nastavena na 305 nm. S L-kolonou ODS (150 × 4.6 mm I.D., 5 μm) byly získány ostré píky (obr. 40 C, D). V retenčních časech M-4, M-7, FV a I.S., tedy v 11.3, 17.1, 12.9 a 14.9 min, nebyly nalezeny interferující píky. Celkový čas jednoho cyklu byl 25 min.



Obr. 40. (A) Chromatogram blank plasmy zkoušené v systému 1, (B) plasma obsahující M-2, M-3, I.S. a M-5 (400 ng/ml), (C) chromatogram blank plasmy zkoušené v systému 2, (D) plasma obsahující M-4, FV, I.S. a M-7 (400 ng/ml) (23).

Stabilita.

Ze stabilitních studií vyplynulo, že se vzorky lze zacházet obvyklým způsobem bez zvláštních opatření, aniž by docházelo k významným ztrátám v obsahu analytů.

Závěr.

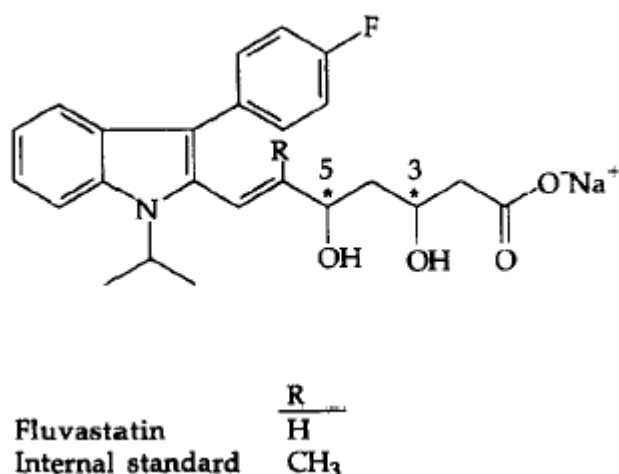
Metoda stanovení fluvastatinu a analytů je dostatečně selektivní, přesná, správná a lineární v rozmezí koncentrací 10-1000 ng/ml (23).

2.6.3.6 Stanovení enantiomerů a racemátu fluvastatinu v lidské plasmě kapalinovou chromatografií s fluorimetrickou detekcí

Helena Toreson, Britt-Marie Eriksson (24)

Fluvastatin byl extrahován z plasmy do methyl-*tert*-butyletheru při pH 6.0. Organická fáze byla odpařena a odparek rekonstituován ve fosfátovém pufru o pH 6.0 s obsahem tetrabutylammoniumfluoridu (TBAF) a methanolu (stanovení racemátu) nebo ve směsi acetonitrilu a vody (stanovení enantiomerů). Výtěžnost racemátu byla 95%, enantiomerů 86%. Limit kvantifikace pro racemát byl 0.5 nmol/l, pro enantiomery 5 nmol/l při použití 0.5 ml plasmy. Vzorčky byly chromatografovány na C₈ koloně (racemát) či na koloně Chiralcel OD-R (enantiomery) a monitorovány fluorescenční detekcí. V achirálním systému byla zvýšena citlivost 4-5 krát postkolonovou expozicí UV záření oproti analýze využívající nativní fluorescenci.

Fluvastatin má v polohách 3 a 5 řetězce karboxylové kyseliny dva asymetrické uhlíky a je racemickou směsí 2 ze 4 možných stereoisomerů (3S, 5R a 3R, 5S). Metoda stanovení fluvastatinu ve formě racemátu po extrakci do methyl-*tert*-butyletheru s použitím tetrabutylammoniumfluoridu v mobilní fázi byla již dříve popsána Kalafským (25).



Obr. 41. *Strukturní vzorce fluvastatinu a vnitřního standardu (24).*

Tato metoda popisuje stanovení enantiomerů a racemátu fluvastatinu a byla aplikována na vzorky plasmy v klinických farmakologických studiích. Racemát byl doposud stanovován u více než tisíce vzorků, zatímco enantiomery jen u 10% z nich. Optimalizací podmínek byla získána výtěžnost 95%. Postkolonovou expozicí UV záření byla zvýšena citlivost v achirálním systému 4 až 5 krát v porovnání s nativní fluorescencí. Chirální systém umožňuje jednoduchou separaci enantiomerů bez derivatizace.

Chromatografický systém.

Chromatografický systém byl složen z čerpadla LKB Model 2248 (Bromma, Švédsko), temperovaného autosampleru Perkin Elmer ISS-200 (Jberlingen, Německo) a fluorescenčního

detektoru Jasco FP-920 (Tokyo, Japonsko). Excitační a emisní vlnová délka byla nastavena na 305 a 390 nm.

Achirální systém.

Achirální chromatografický systém tvořila analytická kolona Zorbax Rx-C8 (150 × 4.6 mm I.D., 5 μm) od Rockland Technologies (Newport, DE, USA) a předkolona Brownlee CN, (15 × 3.2 mm I.D., 7 μm) od Brownlee (Santa Clara, CA, USA). Mobilní fázi tvořil 0.1 M vodný roztok TBAF-fosfátový pufr o pH 6.0 (iontová síla, I = 0,1)-methanol (15:25:60). Teplota kolony byla udržována na 40°C. Mezi analytickou kolonu a detektor byla umístěna fotochemická reakční jednotka od ICT (Frankfurt, Německo) s UV lampou (vlnová délka 254 nm).

Chirální systém.

Chirální systém tvořila kolona Chiralcel OD-R (250 × 4.6 mm I.D., 10 μm) od Daicel Chemical Industries (Japonsko) a předkolona Brownlee Si (15 × 3.2 mm I.D., 7 μm). Mobilní fáze obsahovala acetonitril-fosfátový pufr o pH 2.5 (I = 0.04) (40:60). Rychlost průtoku kolonou byla 0.5 ml/min a teplota kolony byla udržována na 15°C.

Příprava vzorku.

Fluvastatin i vnitřní standard jsou hygroskopické látky citlivé na světlo, proto byla při zacházení s nimi minimalizována expozice vlhkosti a světlu. Vzorky venózní krve v heparinovaných zkumavkách byly zcentrifugovány a plasma byla zmrazena na -20°C. Vzorky plasmy byly rozmrazeny za pokojové teploty, zhomogenizovány a zcentrifugovány. K alikvotním podílům plasmy (500 μl) byl přidán roztok vnitřního standardu (100 μl, 500 nmol/l), acetonitril (500 μl) a 500 μl fosfátového pufru o pH 6.0 (I = 0.5). Vzorky byly extrahovány vytřepáním do MTBE po 30 min. Vodná vrstva byla zmrazena a organická vrstva přenesena do zkumavky a odpařena. Odparek byl rozpuštěn ve 400 μl mobilní fáze a přenesen do autosampleru. Kontrolní vzorky byly připraveny smíšením 100 μl standardního roztoku fluvastatinu ve vodě (500 nmol/l) s 500 μl blank plasmy a dále upraveny způsobem popsaným výše. Stejně byly upraveny vzorky pro stanovení enantiomerů, ale bez přídavku vnitřního standardu. Rekonstituce vzorků byla provedena ve směsi acetonitrilu a vody (40:60) místo mobilní fáze.

Výsledky.

Extrakce.

Výtěžnost fluvastatinu a vnitřního standardu byla stanovena porovnáním extrahovaných vzorků obsahujících známé množství látky s přímými nástřiky standardních roztoků obsahujících stejné množství látky. Výtěžnost byla ovlivněna hodnotou pH vzorku. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při pH 6.0. Při pH vyšším než 6.5 výtěžnost klesala, neboť fluvastatin je při vyšším pH ionizovaný a při nižším pH hrozí rozklad látky. Při použití MTBE (extrakční činidlo použité Kalafským) byla dosažena výtěžnost 95%, ale bez přídavku acetonitrilu před extrakcí byla pouze 60%. Precipitace proteinů acetonitrem tedy usnadnila extrakci fluvastatinu. Při použití jiných rozpouštědel (dichlormethan, diethylether, směs dichlormethanu či hexanu s MTBE) byla výtěžnost nižší. Při stanovování enantiomerů nebyl použit vnitřní standard, neboť druhý pík fluvastatinu (3R, 5S) interferoval s prvním píkem

enantiomeru vnitřního standardu. Nicméně druhý pík (stereoselektivně izolovaný) je možnou alternativou vnitřního standardu.

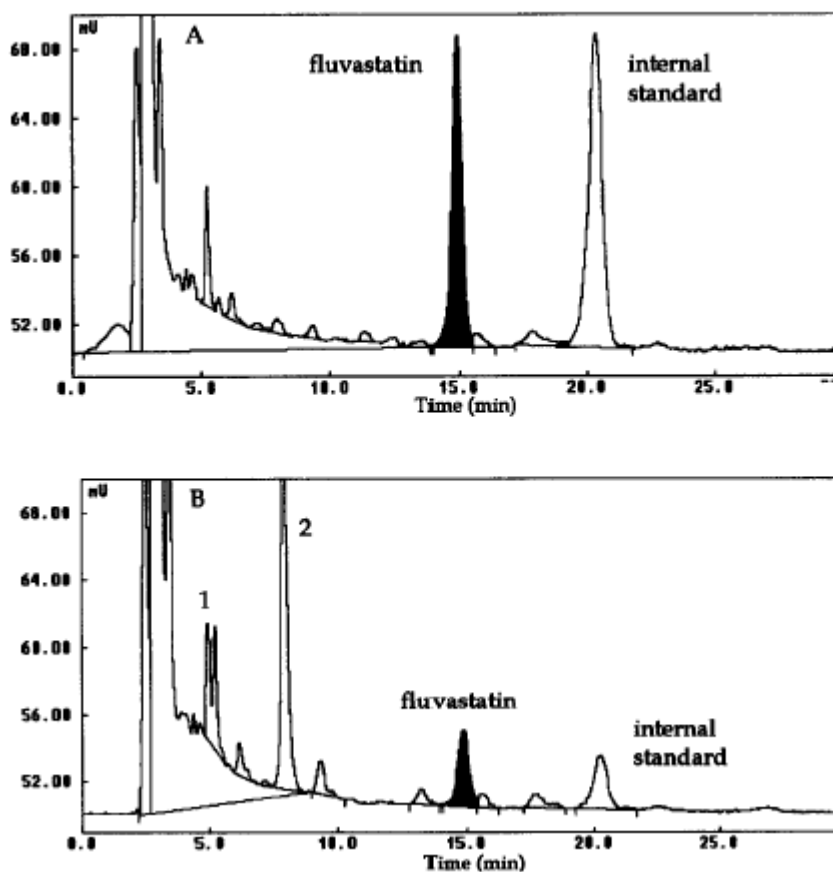
Chromatografické podmínky.

Achirální systém.

V achirálním systému byla účinnost separace a retenční časy ovlivněny koncentrací TBAF v mobilní fázi. Při zvyšování koncentrace TBAF od 0-0,1 mol/l byly retenční časy fluvastatinu a vnitřního standardu zvýšeny 2.5 krát a účinnost kolony vyjádřená jako počet teoretických pater (N) stoupla 1.5 krát. Zvyšování teploty (20 až 50°C) a pH mobilní fáze (3 až 8) neovlivnilo výsledek, ale retenční časy klesaly. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při pH 6.0 a teplotě 40°C. Mezi kolonu a detektor byla umístěna fotochemická reakční jednotka (Beam Boost). Postkolonová expozice UV záření snížila 4-5 krát mez detekce při použití mobilní fáze obsahující 60% methanol ve fosfátovém pufru o pH 6.0 a TBAF. Přítomnost TBAF neovlivňovala mez detekce, zatímco snížení pH mobilní fáze či použití acetonitrilu místo methanolu mělo za následek pokles citlivosti metody. Bez expozice UV záření byly detekovatelné pouze dva metabolity (obr. 42). Použití UV záření je jednoduchý krok zajišťující zvýšení citlivosti stanovení racemátu fluvastatinu. Na obr. 42 jsou chromatogramy autentického vzorku plasmy obsahující 58,8 nmol/l fluvastatinu a 149 nmol/l vnitřního standardu.

Chirální systém.

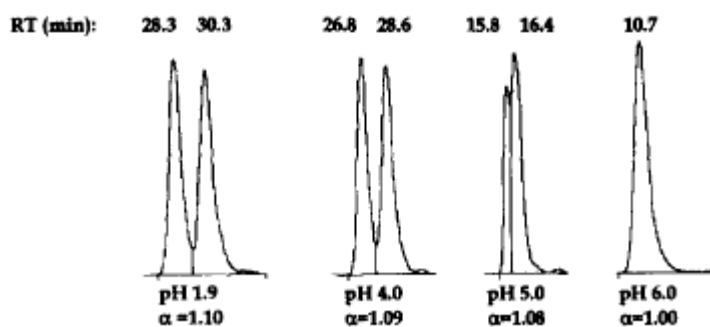
V chirálním systému byla ovlivněna selektivita metody a účinnost kolony teplotou kolony a pH mobilní fáze. Pokles teploty z 35°C na 10°C způsobil zvýšení hodnoty separačního faktoru (α) z 1.06 na 1.11, zatímco účinnost klesla z 9000 na 7000 teoretických pater. Retenční časy byly pouze mírně zvýšeny. Separace enantiomerů byla zlepšena při poklesu pH mobilní fáze a při změně pH v rozmezí od 6.0 do 1.9 byla zvýšena hodnota separačního faktoru z 1.00 na 1.10 (viz obr.43). Pro stanovení byla vybrána teplota 15 °C a pH 2.5. Chromatogram vzorku stanoveného enantioselektivní metodou je na obr. 44. Analýza blank plasmy neprokázala přítomnost interferujících endogenních látek.



Obr. 42. Chromatogramy vzorku lidské plasmy obsahující 58.8 nM fluvastatinu a 149 nM vnitřního standardu;

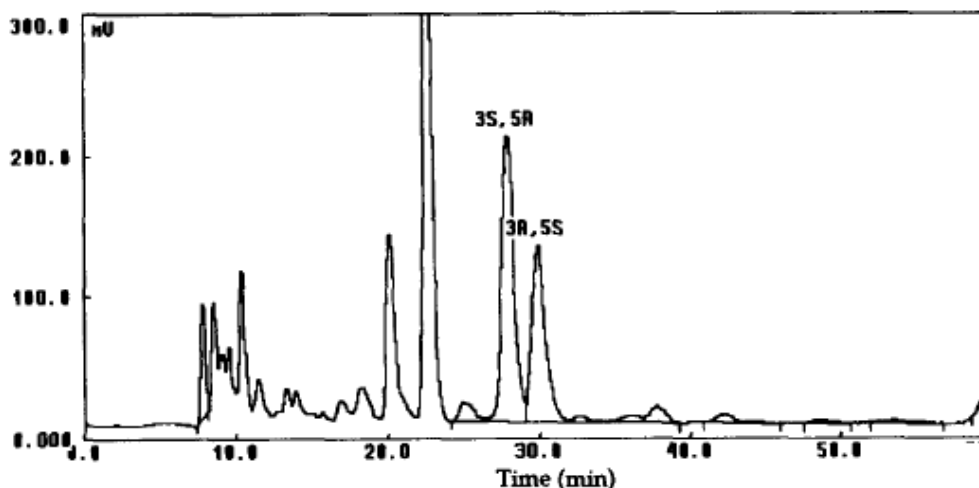
(A) s použitím expozice UV, (B) bez použití expozice UV;

kolona Zorbax Rx-C₈ (150 × 4.6 mm I.D., 5 μm), mobilní fáze 0.1 M TBAF-fosfátový pufr o pH 6.0 (I = 0,1)-methanol (15:25:60). Teplota kolony 40 °C. Nastříkovaný objem 50 μl. (24).



Obr.43. Vliv složení mobilní fáze na separaci enantiomerů; kolona Chiralcel OD-R (250 × 4.6 mm I.D, 10 μm); mobilní fáze acetonitril-fosfátový pufr o pH 2.5 (I = 0.04) (40:60).

Teplota kolony 15 °C. Nastříkovaný objem 100 μl. (24).



Obr. 44. Chromatogram vzorku lidské plasmy obsahující 39.2 nM 3S,5R enantiomer a 24.9 nM 3R,5S enantiomer; kolona Chiralcel OD-R (250 × 4.6 mm I.D, 10 μm); mobilní fáze acetonitril-fosfátový pufr o pH 2.5 (I = 0.04) (40:60). Teplota kolony 15 °C. Nastříkovaný objem 100 μl. (24).

Stabilita.

Fluvastatin a vnitřní standard jsou látky citlivé na světlo. Jejich vodné roztoky jsou stabilní minimálně jeden den, pokud jsou skladovány ve tmě. V plasmě je fluvastatin stálý nejméně 2 h na přímém světle. Standardní roztoky byly chráněny před světlem obalením baněk hliníkovou fólií a skladováním v chladničce. Fluvastatin je stabilní 5 měsíců při – 20 °C a nejméně jeden den při pokojové teplotě chráněný před světlem. Stanovované vzorky byly stabilní v temperovaném autosampleru (10°C) více než dva dny.

Závěr.

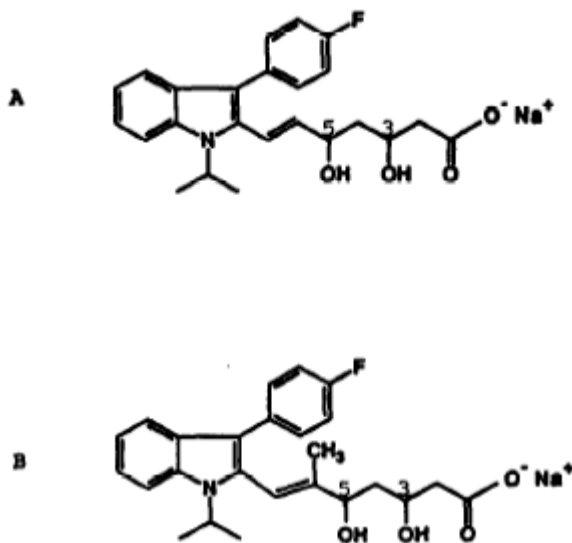
Tato metoda stanovení enantiomerů a racemátu fluvastatinu v krevní plasmě se vykazuje vysokou přesností a výtěžností. Enantiomery byly jednoduše a spolehlivě stanoveny bez derivatizace a v achirálním systému byla pětinasobně zvýšena citlivost po expozici eluátu UV záření (24).

2.6.3.7 Stanovení fluvastatinu v lidské plasmě metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Gaetana Kalafsky, Harold T. Smith (25)

Sodná sůl fluvastatinu a vnitřní standard byly extrahovány z okyselené plasmy do methyl-*tert*-butyletheru (MTBE) a alikvotní podíly organické fáze byly odpařeny do sucha. Po rekonstituci v malém množství mobilní fáze tvořené směsí methanol-13 mM fluorid tetrabutylamonný (TBAF) v poměru 3:2 (v/v) byl vzorek dávkován na C₁₈ kolonu temperovanou na 50 °C. K monitorování fluvastatinu (ve formě volné kyseliny) a vnitřního standardu byla použita fluorimetrická detekce (excitační vlnová délka 305 nm a emisní vlnová délka 380 nm). Metodou lze přesně stanovit až 1 ng/ml fluvastatinu s použitím 1.0 ml plasmy. Léčivo lze stanovit v rozmezí linearit metody s přesností 5.57% a reprodukovatelností 7.32%.

Fluvastatin (obr. 45) je syntetické léčivo ve formě racemické směsi dvou enantiomerů (3S, 5R a 3R,5S). Jako vnitřní standard byla použita sloučenina 63-267 syntetizovaná v laboratořích Sandoz. Chemicky jde o sodnou sůl [R*, S*-(E)-] (±)-7-[3-(4-fluorfenyl)-1-(1-methylethyl)-1H-indol-2-yl]-3,5-dihydroxy-6-methyl-6-heptenové kyseliny.



Obr. 45. Chemické struktury fluvastatinu (A) a vnitřního standardu (B). (25)

Chromatografické podmínky.

Pro separaci na obrácených fázích byla použita Supelcosil LC-18, 150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm kolona (Supelco, Bellfonte, PA, USA) temperovaná na 50 °C.

Příprava standardních roztoků.

Fluvastatin a použitý vnitřní standard jsou hygroskopické látky citlivé na světlo. Proto musí být při zacházení s nimi zabráněno expozici vlhkostí a slunečním světlem. Byly

připraveny zásobní vodné roztoky obou sloučenin, které byly po zředění na potřebnou koncentraci použity k přípravě standardních roztoků.

Příprava vzorku.

Stejně díly plasmy a acetonitrilu byly zhomogenizovány, poté byl přidán roztok vnitřního standardu, fosfátový pufr a MTBE. Obsah zkumavek byl protřepáván 15 min v horizontální poloze, poté zcentrifugován a organická fáze byla odpařena do sucha. Před nástřikem na kolonu byl opdarek rozpuštěn v malém množství mobilní fáze.

Limit stanovení.

Bylo dosaženo limitu stanovení 1 ng/ml.

Selektivita stanovení.

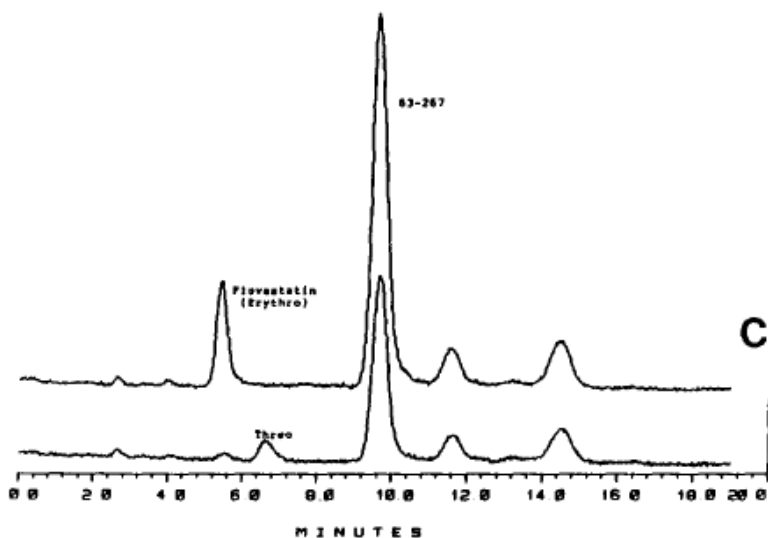
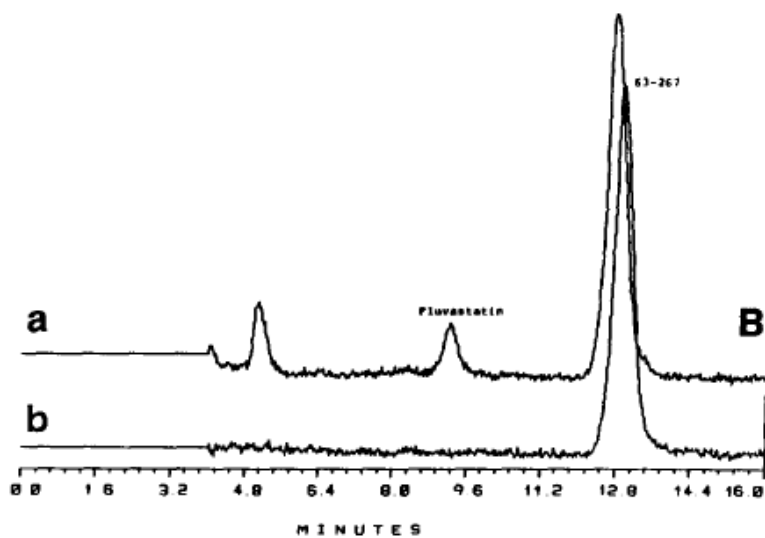
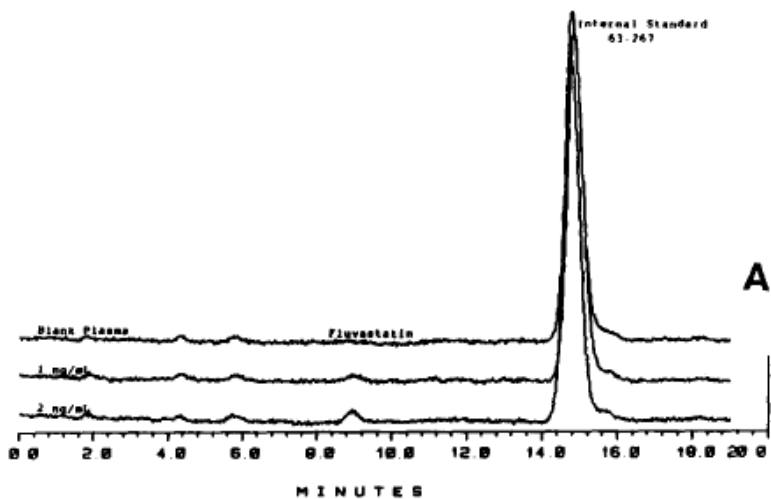
Enantiomery fluvastatinu (3S, 5R a 3R,5S) nelze při použití této metody rozdělit, ale erythro a threo diastereoisomery ano (obr. 46). Léčivo bylo chromatograficky odděleno od vnitřního standard a endogenních látek pozorovaných v lidské plazmě (obr.46). Separace analytů od endogenních látek byla optimalizována pro každou sérii stanovení změnou složení (1-5%) mobilní fáze. Přídavek TBAF vedl ke zvýšení účinnosti kolony, symetrie píků a selektivity, a tím byla umožněna separace diastereomerů. Chromatogramy na obr. 46 vznikly při různých sériích stanovení, a proto se liší hodnoty retenčních časů. Rozdílné retenční časy na obr. 46 A a 46 C byly naměřeny v důsledku použití různých kolon (nová a použitá) a mírně odlišného složení mobilní fáze. Metoda byla aplikována ve studiích biodostupnosti a farmakokinetiky léčiva; nebyly detekovány interference endogenních látek z plasmy či metabolitů léčiva.

Aplikace metody.

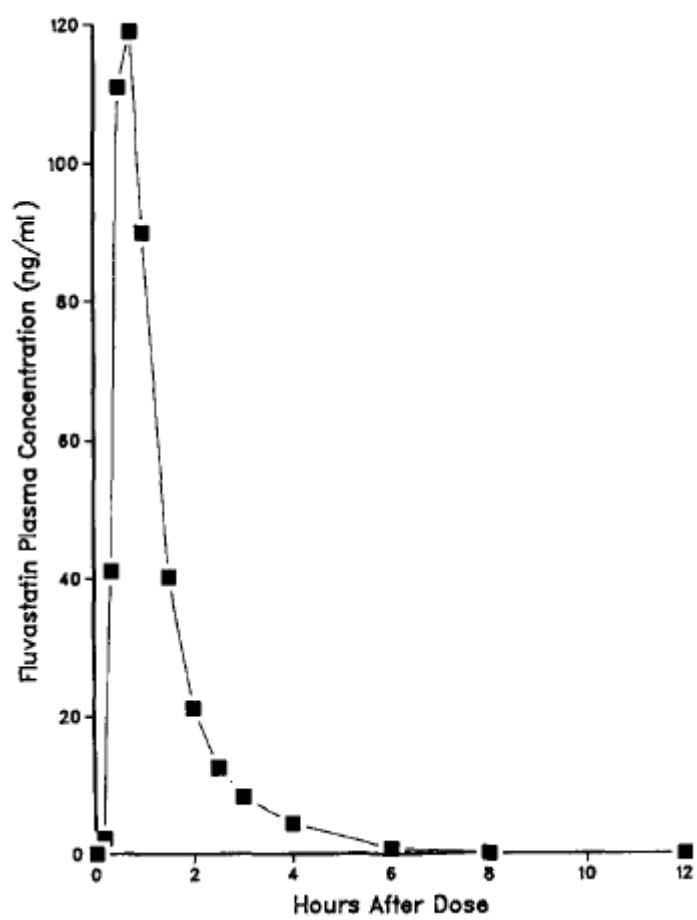
Metoda byl použita v několika klinických studiích. Pro každé stanovení byla zvlášť vypracována kalibrační křivka. Kontrolní a standardní vzorky byly smíchány s neznámými vzorky plasmy za účelem zjištění jakýchkoliv dočasných změn, které mohou nastat během jedné série analýz. Průměrné plasmatické koncentrace naměřené po jednorázovém perorálním podání 20 mg léčiva zdravým dobrovolníkům jsou na obr. 47. Plasmatické koncentrace byly měřitelné do 4 h po podání s maximální naměřenou koncentrací v čase 0.75 h.

Závěr.

Touto metodou lze oddělit léčivo a vnitřní standard od endogenních a fluorogenních látek v lidské plasmě. Metoda je citlivá a spolehlivá, vhodná pro rutinní stanovení v klinických studiích (25).



Obr. 46. Chromatogramy vzorků obsahujících léčivo a vnitřní standard:
 (A) standardní vzorky obsahující léčivo v koncentracích 1 ng/ml a 2 ng/ml vs. vzorek blank plasmy; (B) vzorek plasmy 1 h po podání 20 mg léčiva (a); vs. vzorek plasmy před podáním léčiva (b); (C) erythro vs. threo diastereomery v plasmě (25).



Obr. 47. Průměrné plasmatické koncentrace fluvastatinu po perorálním podání 20 mg (25).

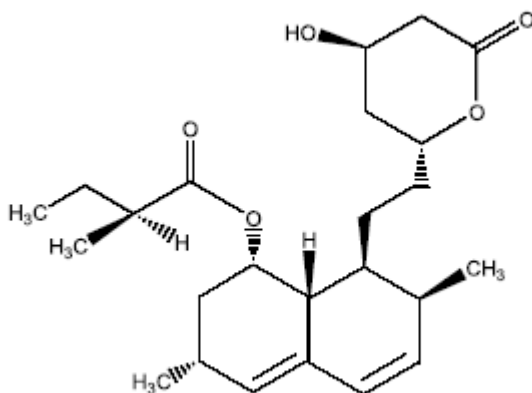
2.6.3.8 Stanovení fluvastatinu metodou HPLC s fluorimetrickou detekcí

Al-Rawithi, Sameer; Hussein, Rajaa F.; Alzahrani, Ali (26)

Autoři popsali rychlou, specifickou a velmi citlivou HPLC metodu stanovení hladiny fluvastatinu (FV) s použitím atorvastatinu jako vnitřního standardu (IS). Po deproteinaci 1 ml plasmy acetonitrilem bylo léčivo a vnitřní standard extrahovány *tert*-butylmethyletherem (TMBE). Separace byla provedena na cartridge 8 mm × 10 cm Nova Pak C₁₈ s velikostí částic 4 μm. Mobilní fáze byla složena z vodného roztoku 20 mM dihydrogenfosforečnanu sodného a 1 mM laurylsíranu sodného upravená na pH 7.0 kyselinou fosforečnou v acetonitrilu (70:30, v/v). Složky byly detekovány fluorimetricky při excitační vlnové délce 305 nm a emisní vlnové délce 380 nm. Za těchto podmínek byl retenční čas FV 8.8 min a IS 10.6 min. Odpověď detektoru byla lineární ($r > 0.999$) v širokém rozmezí zkoumaných koncentrací (0.5-1000 ng/ml). Metoda je běžně používána při terapeutickém monitorování a farmakokinetických studiích FV u pacientů s hypercholesterolemií (26).

2.6.4 Lovastatin

[(1S,3R,7S,8S,8aR)-8-{2-[(2R,4R)-4-hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl]ethyl}3,7--dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaftalen-1-yl]-(2S)-2-methylbutanoát.



Lovastatin (mevinolin) je prvním objeveným léčivem mezi statiny. Je produkován houbou *Aspergillus terreus* a jinými vláknitými druhy hub jako sekundární metabolit.

Lovastatin je obtížně absorbován z gastrointestinálního traktu. Jeho vstřebávání zvyšuje přítomnost potravy; plasmatické koncentrace aktivního léku podaného nalačno činí zhruba 2/3 hladiny dosažené při podávání spolu s jídlem. V játrech je hydrolyzován nespecifickou karboxyesterázou na aktivní formu β -hydroxykyseliny. Léčivo i aktivní metabolity jsou více než z 90% vázány na plasmatické bílkoviny. Lovastatin podléhá rozsáhlému first-pass metabolismu v játrech a méně než 5% perorální dávky dosáhne systémové cirkulace (27).

2.6.4.1 Měření hladin lovastatinu v plasmě při automatickém odbírání vzorků

Shau-Chun Wang et al. (27)

Preklinické farmakokinetické studie jsou často prováděny na malých zvířecích modelech a bylo prokázáno, že podmínky studie mohou způsobit u zvířat stres, který ovlivňuje farmakokinetiku léčiva. Cílem této metody bylo vyvinout automatický systém odběru vzorků u volně se pohybujících potkanů a aplikovat jej ve farmakokinetických studiích.

Vzorky krve byly odebírány pomocí automatizovaného systému DR-II a vzorky výkalů v metabolické kleci. Koncentrace lovastatinu byla stanovena pomocí chromatografického systému s UV detekcí. Mobilní fáze obsahující acetonitril a 10 mM NaH₂PO₄ v poměru 60:40 (v/v) měla průtokovou rychlost 1 ml/min. Kalibrační křivka byla lineární v rozmezí koncentrací 0.05–100 a 0.1–100 µg/ml v plasmě a ve výkalech. Z farmakokinetických studií vyplynulo, že maximální dosažená koncentrace lovastatinu byla 1.18 ± 0.08 µg/ml ve 120 min a téměř 78% podané dávky (500 mg/kg, p.o.) bylo během 48 h vyloučeno.

Standard lovastatinu vysoké čistoty (98.5–101.0%) byl rozpuštěn v acetonitrilu v koncentraci 1 mg/ml ve vialce z tmavého skla a skladován při 4°C. Vnitřní standard (chlorpromazin, 1 µg/ml) byl rozpuštěn v acetonitrilu.

Kapalinová chromatografie.

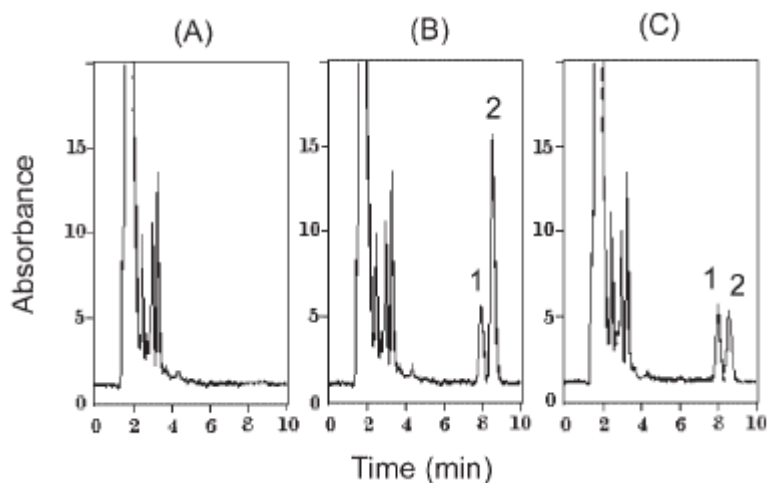
HPLC systém zahrnoval čerpadlo (BAS PM-80, West Lafayette, IN, USA), injektor Rheodyne Model 7125 s 20 µl dávkovací smyčkou, UV detektor (Linear Model 340, San Jose, CA, USA). Separace byla uskutečněna na LiChrosorb RP18 koloně (Merck, 250 × 4 mm i.d.; velikost částic 5 µm) s acetonitrilem a 10 mM NaH₂PO₄ v poměru 60:40 (v/v). Vlnová délka UV detekce byla 237 nm.

Odběr a příprava vzorku.

Lovastatin byl podáván perorálně (500 mg/kg) či do femorální žíly (10 mg/kg). Automatizovaný systém odběru krve DR-II (Eicom Corp., Kyoto, Japonsko) byl použit u volně se pohybujících potkanů. 150 µl vzorku bylo odebíráno z jugulární žíly do heparinizované vialky v daných časových intervalech. Každý vzorek byl zcentrifugován a záskaná plasma byla zhomogenizována s roztokem vnitřního standardu. Denaturované proteiny byly odděleny centrifugací. Supernatant byl přímo nastříkovan na kolonu.

Výsledky.

Separace lovastatinu od endogenních látek a stanovení s použitím chlorpromazinu jako vnitřního standardu za popsaných chromatografických podmínek byly provedeny s dostatečnými výsledky. Chromatogramy získané při vlnové délce 237 nm po nástřiku vzorků plasmy měly stálou základní linii a reprodukovatelné píky lovastatinu a chlorpromazinu. Vlnová délka 237 nm je maximum absorpce lovastatinu určená DAD detektorem. Píky vnitřního standardu a lovastatinu vykazovaly retenční časy v 7.8 a 8.6 min. Tyto píky byly oděleny od endogenního materiálu, který byl eluován do 6. min.

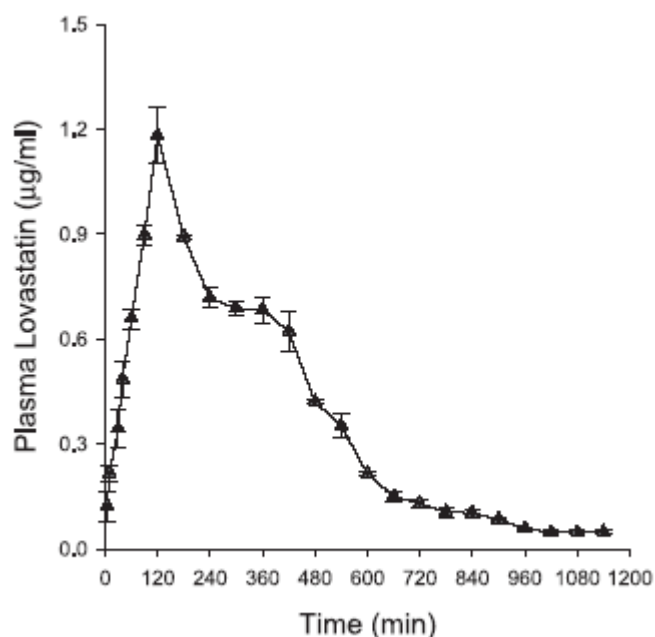


Obr. 48. Chromatogram blank plasmy se základní linií a píky endogenních látek před 6.min (A), chromatogram standardního vzorku lovastatinu (5 µg/ml) (B) a chromatogram vzorku plasmy odebrané ve 120 min po podání lovastatinu (500 mg/kg, p.o.) (C). (27).

V rozmezí 0.1–100 µg/ml byly koncentrace lovastatinu v plasmě lineárně proporcionální ploše píků vztahených k ploše píku vnitřního standardu. Limit detekce (LOD) byl stanoven na 20 ng/ml při poměru signálu k šumu 3. Limit kvantifikace (LOQ, poměr signálu k šumu přibližně 10) byl 0.1 µg/ml.

Přesnost definovaná hodnotou RSD se pohybovala v rozmezí 0.5 a 11.0 %. Analytická správnost vyjádřená jako procentuální rozdíl mezi průměrem naměřených hodnot a známých koncentrací byla v rozmezí od -8.1 do 7.7 %. Výťažnost lovastatinu z plasmy byla 97.7 ± 1.6 %.

Na obrázku 49 je graf závislosti koncentrace lovastatinu na čase po jednorázové perorální dávce. Plocha pod křivkou měla hodnotu 462.64 min µg/ml pro perorálně podaný lovastatin (500 mg/kg).



Obr. 49. Průměrné plasmatické koncentrace lovastatinu v plasmě potkanů po perorálním podání 500 mg/kg. (27).

2.6.4.2 Stanovení lovastatinu a příslušné hydroxykyseliny v plasmě potkanů a myši metodou kapalinové chromatografie/tandemové hmotnostní spektrometrie

Yunhui Wu, Jamie Zhao, Jack Henion, Walter A. Korfmacher, Amelia P. Lapiguera a Chin-Chung Lin (28)

K izolaci lovastatinu (LV) a metabolitu hydroxykyseliny (LVA) z biologického materiálu (0.1 ml plasmy potkana či myši) byla použita extrakce na pevnou fázi (SPE). Rekonstituované vzorky byly analyzované LC/MS/MS s použitím vnitřních standardů simvastatinu (SV) a simvastatin hydroxykyseliny (SVA). Metodou byl dosažen limit stanovení (LOQ) 0.5 ng/ml LV či LVA v plasmě potkanů a myši. Výtěžnost LV byla 54% z plasmy myši a 55% z plasmy potkanů, výtěžnost LVA byla 100% z plasmy myši a 67% z plasmy potkanů.

Lovastatin je podáván ve formě laktonu, který je rychle konvertován v játrech na aktivní metabolit hydroxykyselinu. Metoda LC/MS/MS umožňuje simultánní stanovení LV a LVA v požadovaných koncentracích v plasmě myši a potkanů.

Přístrojové vybavení.

Pro extrakci byla použita Bond Elut C₈ SPE cartridge 1 ml/100 mg (Varian, Harbor City, CA, USA).

Separace byla uskutečněna na koloně Kromasil C₁₈ (50 × 2 mm i.d., 5 μm) od Keystone Scientific, Bellefonte, PA, USA, s použitím gradientové eluce 1 mM vodným roztokem octanu amonného (pH 4.0, upraveno ledovou kyselinou octovou) a acetonitrilem (ACN). Gradient: t = 0 min, 60% ACN; t = 3 min, 80% ACN; t = 3.1 min 90% ACN; t = 4.1 min, 90% ACN; t = 5 min, 60% ACN. K detekci byl použit PE-SCIEX (Tornhill, Ontario, Kanada) API III⁺ hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupolem.

Příprava vzorku.

Zásobní roztoky LV a SV byly připraveny z acetonitrilu a roztoky LVA a SVA ze směsi acetonitril-voda (90:10). Koncentrace hydroxykyselin byla vypočtena pro formu volných kyselin. Zásobní roztoky byly po zředění použity pro sestavení kalibrační křivky. Ke vzorku plasmy byl přidán roztok standardního vzorku. Ke vzorku double blank plasmy byla přidána směs acetonitril-voda (90:10) a ke vzorku blank plasmy byl přidán roztok vnitřního standardu. Každý vzorek byl poté zředěn vodou. Vzhledem k malé stabilitě LV v biologickém materiálu při běžné teplotě byla příprava vzorků prováděna v ledové lázni.

Extrakce.

Extrakční cartridge byla aktivována methanolem a vodou, poté byl vložen zředěný vzorek. Cartridge byla postupně promyta vodou, 5% kyselinou mravenčí, vodou a usušena. Analyty byly eluovány směsí methanol-voda (70:30). Po aplikaci vakua byla cartridge znovu vysušena. Druhá frakce analytů byla eluována acetonitrilem a cartridge vysušena. Směsný eluát byl odpařen dosucha a odparek rekonstituován ve směsi octan amonný (1 mM, pH 4.0)-acetonitril (30:70). Po homogenizaci byly vzorky přeneseny na kolonu.

Výsledky.

Nejvyšší citlivost detekce byla dosažena, pokud byly analyty detekovány za opačných polaritních podmínek. LV byl stanovován pomocí prekurzorového iontu $[M + Na^+]$ a LVA pomocí iontu $[M-H^-]$. Při ionizaci za vzniku pozitivních iontů převažovaly produkty ve formě sodných aduktů, ačkoli při úpravě vzorku ani v mobilní fázi nebyl použit jejich zdroj. Předpokládá se, že pochází z použitých skleněných obalů a biologické matrix. Využitím automatické změny polaritity při ionizaci byly optimalizovány podmínky separace LV/SV a LVA/SVA tak, aby byla uskutečněna v krátkém čase. K získání potřebných dat tedy stačilo provést analýzu jednoho vzorku obsahujícího všechny čtyři sloučeniny. Na obr. 50 je příklad SRM chromatogramů LV, LVA, SV a SVA získaných ze vzorků standardních roztoků.

Vzorky plasmy.

K izolaci LV, LVA a vnitřních standardů z biologické matrix byla vyvinuta metoda extrakce na pevnou fázi. Spojené frakce byly odpařeny, znovu rozpuštěny a vloženy do LC/MS/MS systému. Pro LV a LVA byl dosažen limit stanovení 0.5 ng/ml při použití 0.1 ml plasmy.

Specifičnost stanovení.

Specifičnost byla potvrzena nepřítomností interferujících látek v plasmě neobsahující léčivo. Interference chemických látek z plasmy byla minimalizována kombinací metod HPLC, MS/MS, výběrem režimu ionizace a hmotnostních spekter.

Linearita.

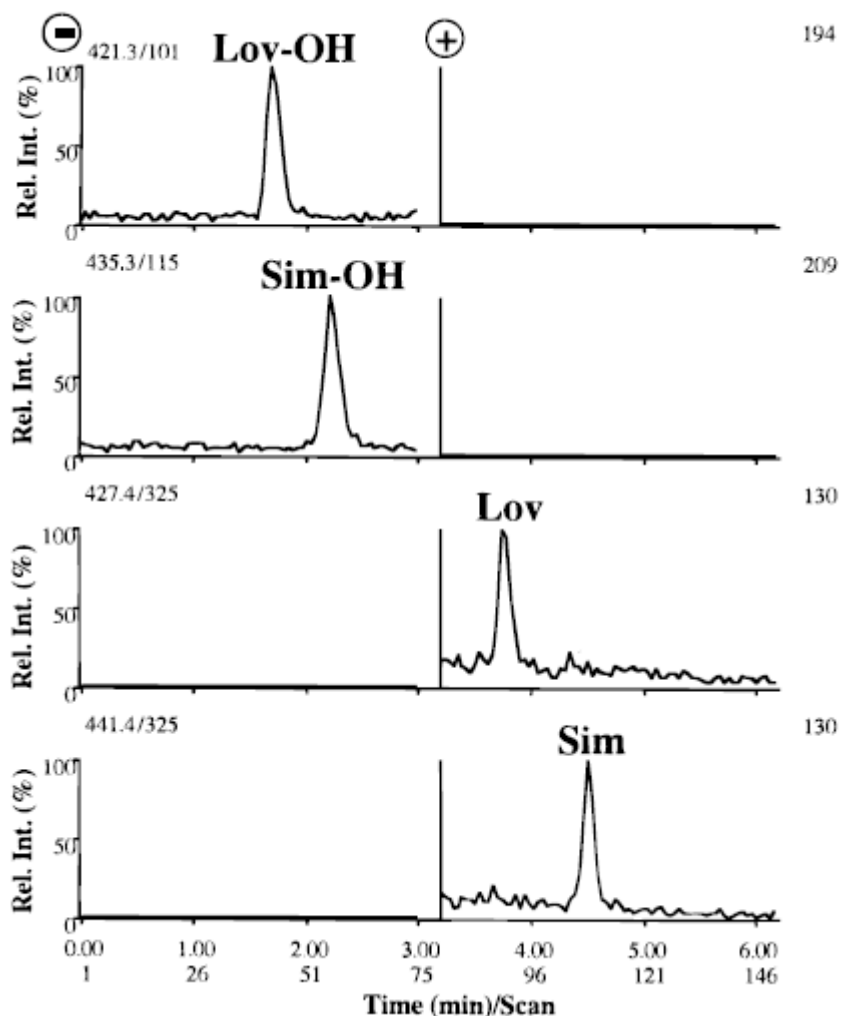
Kalibrační křivka byla lineární v rozmezí koncentrací LV a LVA 0.5 – 100 ng/ml plasmy.

Limit stanovení (LOQ) a výtěžnost.

Limit stanovení LV a LVA, definovaný jako nejnižší koncentrace stanovitelná s přijatelnou hodnotou správnosti a přesnosti, v plasmě myši a potkanů byl 0.5 ng/ml. Výtěžnost LV a LVA v myši plasmě byla 54% a 100%, SV a SVA 66% a 96%. V plasmě potkanů byla výtěžnost LV a LVA 55% a 67%, SV a SVA 69% a 74%. Výtěžnost analytů nebyla závislá na koncentraci v testovaném rozmezí.

Stabilita.

LVA je v plasmě stabilní za obyčejné teploty, zatímco LV musí být uchováván v ledové lázni (4 °C). LV je rovněž nestabilní v použité mobilní fázi za běžné teploty; nicméně vykazoval stabilitu při teplotě 4 °C po dobu 24 h.



Obr. 50. SRM LC/MS záznamy standardních roztoků s obsahem lovastatin hydroxykyseliny (Lov-OH), simvastatin hydroxykyseliny (Sim-OH), lovastatinu (Lov) a simvastatinu (Sim). Každý vzorek obsahoval 10 pg referenční látky (28).

Závěr.

Tato LC/MS/MS metoda poskytuje několik výhod: příprava vzorku je relativně jednoduchá a nevyžaduje derivatizaci; objem plasmy pro analýzu je pouze 100 μ l; je velmi citlivá a selektivní vzhledem k možnosti přepínání polarity při MS/MS stanovení v rámci jedné analýzy. Malý objem použité plasmy je aplikovatelný a zároveň požadovaný v metodách směřujících k miniaturizaci vzorku (28).

3 Závěr

3 Závěr

Byla provedena kompletní rešerše možností stanovení statinů analytickými metodami HPLC a GC. Jednotlivé práce jsou citovány i s obrazovými přílohami a byly zmíněny i konkrétní postupy s důrazem na kritické části analýzy. Byly diskutovány aspekty specifické pro stanovení statinů jako léčiv obecně, zejména problematika konverze laktonů, a poté byla začleněna jednotlivá stanovení.

Zpracované metody jsou velmi citlivé a zpravidla vyžadují finančně náročné přístrojové vybavení pro MS detekci. Zahrnuty byly také metody méně citlivé, které však vynikaly jednoduchostí provedení a dostupností. U sloučenin s vhodnými optickými vlastnostmi (fluvastatin) bylo možné použít fluorimetrickou detekci, která je značně citlivá, finančně nenáročná a jednoduchá na provedení. V některých případech byla sloučenina převedena vhodnou derivatizační reakcí na derivát s požadovanými vlastnostmi, tím se však prodloužila doba analýzy.

Z uvedeného vyplývá, že moderní analytická metoda musí splňovat následující kritéria: rychlost provedení, jednoduchost úpravy vzorku, dostatečná citlivost pro stanovení terapeutických hladin léčiva, selektivita a specifčnost stanovení. Výzva spočívá v nalézání takových metod, které spojují výše zmíněné požadavky s finanční přijatelností.

Seznam použité literatury.

- [1] Shitara Y, Sugiyama Y: *Pharmacol Therapeut*, Vol. 112, Issue 1, p. 71-105 (2006)
- [2] Md. Khalid Pasha, Syed Muzeeb, Shaik Jafar Sadik Basha, Dhanya Shashikumar, Ramesh Mullangi a Nuggehally R. Srinivas: *Biomed Chromatogr*, Vol. 20, p.282–293 (2006)
- [3] Deng-Jye Yang, Lucy Sun Hwang: *J Chromatogr A*, Vol. 1119, Issue 1-2, p. 277-284 (2006)
- [4] Morris MJ, Gilbert JD, Hsieh JY-K, Matuszewski BK, Ramjit HG, Bayne WF: *Biol Mass Spectrom*, Vol. 22, Issue 1, p.1-8 (1993)
- [5] Singhvi SM, Pan HY, Morrison RA a Willard DA: *Brit J Clin Pharmacol*, Vol. 29, p. 239 (1990)
- [6] Sidika Erturk, Armagan Onal, Sevil Muge Cetin: *J Chrom B*, Vol. 793, p.193–205 (2003)
- [7] Mohammed Jemal, Yuan-Qing Xia: *J Pharmaceut Biomed*, Vol. 22, p.813–827 (2000)
- [8] Mohammed Jemal a Zheng Ouyang: *Rapid Commun Mass Sp*, Vol. 14, p.1757–1765 (2000)
- [9] Black A, Sinz MW, Hayes RN a Woolf TW: *Drug Metab Dispos*, Vol. 26, p.755-763 (1998)
- [10] Ramakrishna V. S. Nirogi, Vishwottam N. Kandikere, Manoj Shukla, Koteswara Mudigonda, Santosh Maurya, Ravikumar Boosi a Yerramilli Anjaneyulu: *Biomed Chromatogr*, Vol. 20, Issue 9, p. 924-936 (2006)
- [11] Lennernas H.: *Clin Pharmacokinet*, Vol. 42, p.1141-1160 (2003)
- [12] Bullen William W, Miller Ronald A a Hayes Roger N: *J Am Soc Mass Spectr*, Vol. 10, p.55–66 (1999)
- [13] Mohammed Jemal, Zheng Ouyang, Bang-Chi Chen a Deborah Teitz: *Rapid Commun Mass Sp*, Vol. 13, p.1003–1015 (1999)
- [14] Hermann M, Christensen H, Reubsaet JLE: *Anal Bioanal Chem*, Vol. 382, p.1242–1249 (2005)
- [15] Gholamreza Bahrami, Bahareh Mohammadi, Shahla Mirzaeei, Amir Kiani: *J Chromatogr B*, Vol. 826, p.41–45 (2005)
- [16] Barrett B, Huclová J, Bořek-Dohalský V, Němec B, Jelínek I: *J Pharmaceut Biomed*, Vol. 41, p.517–526 (2006)
- [17] Zhao Jamie J, Xie Iris H, Yang Amy Y, Roadcap Brad A a Rogers JD: *J Mass Spectrom*, Vol. 35, p.1133–1143 (2000)

- [18] Haitao Yang, Yan Fen , Yiwen Luan: *J Chromatogr B*, Vol. 785, p.369–375 (2003)
- [19] Mohammed Jemal, Zheng Ouyang, Mark L. Powell: *J Pharmaceut Biomed*, Vol. 23, p.323–340 (2000)
- [20] Hisao Ochiai, Naotaka Uchiyama, Kazuhide Iwasaki, Shunsuke Hata, Toshio Kamei: *J Chromatogr B*, Vol. 694, p. 211 – 217 (1997)
- [21] Hans Jorg Leis a Werner Windischhofer: *Rapid Commun Mass Sp*, Vol. 19, p.128–132 (2005).
- [22] Vera Lucia Lanchote , Adriana Rocha , Flavio Ulliana Vieira de Albuquerque , Eduardo Barbosa Coelho , Pierina Sueli Bonato: *J Chromatogr B*, Vol. 765, p. 1–88 (2001)
- [23] Akinori Nakashima, Christoph Saxer, Miyuki Niina, Naoki Masuda, Kazuhide Iwasaki, Kotaro Furukawa: *J Chromatogr B*, Vol. 760, p. 17–25 (2001)
- [24] Helena Toreson, Britt-Marie Eriksson: *J Chromatogr A*, Vol. 729, p. 13-18 (1996)
- [25] Gaetana Kalafsky a Harold T. Smith: *J Chromatogr B: Biomed Appl*, Vol. 614, Issue 2, p. 307-313 (1993)
- [26] Al-Rawithi, Sameer; Hussein, Rajaa F.; Alzahrani, Ali: *Ther Drug Monit*, Vol. 25, p. 88-92 (2003)
- [27] Shau-Chun Wang, Li-Kai Ho, Jiin-Cherng Yen a Tung-Hu Tsai: *Biomed Chromatogr*, Vol. 20, Issue 9, p. 911-916 (2006)
- [28] Yunhui Wu, Jamie Zhao, Jack Henion, Walter A. Korfmacher, Amelia P. Lapiguera a Chin-Chung Lin: *J Mass Spectrom*, Vol. 32, p. 379-387 (1997)
- [29] Suchopár J a kol., *Kompendium lékových interakcí*, Infopharm[®] a.s. (2004).
- [30] Cilla DD Jr, Whitfield LR, Gibson DM, Sedman AJ, Posvar EL: *Clin Pharmacol Ther*, Vol. 60, p. 687 (1996)
- [31] Gibson DM, Bron NJ, Richens A, Hounslow NJ, Sedman AJ, Whitfield LR: *J Clin Pharmacol*, Vol. 36, p. 242 (1996)
- [32] Shumm YY, Huang N, Walter G, Black A, Sekerke C, Chang T, Whitfield LR: *Ther Drug Monit*, Vol. 20, p. 41 (1998)
- [33] Siedlik PH, Olson SC, Yang BB, Stern RH: *J Clin Pharmacol*, Vol. 39, p. 501 (1999)
- [34] Radulovic LL, Cilla DD, Posvar EL, Sedman AJ, Whitfield LR: *J Clin Pharmacol*, Vol. 35, p. 990 (1995)
- [35] Posvar EL, Radulovic LL, Cilla DD, Whitfield LR, Sedman AJ: *J Clin Pharmacol*, Vol. 36, p. 728 (1996)

- [36] Zarghi A, Shafaati A, Foroutan S, Khoddam A: *Arzneimittel-Forsch*, Vol. 55, p. 451 (2005)
- [37] Koytchev R, Ozalp Y, Erenmemisogler A, van der Meer M, Alpan RS: *Arzneimittel-Forsch*, Vol. 54, p. 573 (2004)
- [38] Takano T, Abe S, Hata S: *Biol Mass Spectrom*, Vol. 19, p. 577-581 (1990)
- [39] Carlucci G, Mazzeo P, Biordi L, Bologna M: *J Pharmaceut Biomed*, Vol. 10, p. 693-697 (1992)
- [40] Miao XS, Metcalfe CD: *J Chromatogr A*, Vol. 998, p. 133-141 (2003)
- [41] Dogrukol-Ak D, Kircali K, Tuncel M, Aboul-Enein HY: *Biomed Chromatogr*, Vol. 15, p. 389 (2001)