

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠA BRAČIČ

**DIPLOMSKA NALOGA**  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠA BRAČIČ

**RAZVOJ IN VALIDACIJA LC – MS/MS METODE  
ZA DOLOČANJE RAMIPRILA IN RAMIPRILATA  
V PLAZEMSKIH VZORCIH**

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF LC – MS/MS  
METHOD FOR DETERMINATION OF RAMIPRIL AND  
RAMIPRILAT IN PLASMA SAMPLES

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo UL, pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos, mag. farm.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Mojci Kerec Kos za mentorstvo pri izdelavi diplomske naloge. Posebna zahvala tudi doc. dr. Tomažu Vovku in asist. dr. Juriju Trontlju za pomoč pri delu in nasvete. Hvala tudi vsem članom Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko. Hvala družini in prijateljem za podporo skozi vsa leta študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos.

Maruša Bračič

Ljubljana, 2013

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Član diplomske komisije: izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.

# VSEBINA

<b>VSEBINA</b> .....	<b>I</b>
<b>POVZETEK</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>V</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 SRČNO POPUŠČANJE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 RENINSKI – ANGIOTENZINSKI – ALDOSTERONSKI SISTEM</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 RAMIPRIL IN RAMIPRILAT</b> .....	<b>5</b>
<i>1.3.1 Farmakodinamične lastnosti</i> .....	<i>7</i>
<i>1.3.2 Farmakokinetične lastnosti</i> .....	<i>8</i>
<b>1.4 ANALIZNE METODE ZA DOLOČEVANJE RAMIPRILA IN RAMIPRILATA V PLAZMI</b> .....	<b>9</b>
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	<b>12</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1 MATERIALI</b> .....	<b>13</b>
<i>3.1.1 Biološki material</i> .....	<i>13</i>
<i>3.1.2 Standardi</i> .....	<i>13</i>
<i>3.1.3 Reagenti in topila</i> .....	<i>14</i>
<i>3.1.4 Naprave in pribor</i> .....	<i>14</i>
<b>3.2 METODE</b> .....	<b>16</b>
<i>3.2.1 Priprava osnovnih topil, raztopin in pufrov</i> .....	<i>16</i>
<i>3.2.2 Priprava plazemskih vzorcev</i> .....	<i>20</i>
<i>3.2.3 Razvoj metode z uporabo HPLC – UV</i> .....	<i>21</i>
<i>3.2.4 Razvoj metode z uporabo LC – MS/MS</i> .....	<i>23</i>
<i>3.2.5 Validacija metode</i> .....	<i>24</i>
<i>3.2.6 Analiza realnih plazemskih vzorcev</i> .....	<i>32</i>

<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>METODA HPLC – UV</b>	<b>33</b>
<b>4.2</b>	<b>METODA LC – MS/MS</b>	<b>37</b>
4.2.1	<i>Optimizacija metode MS/MS</i>	38
4.2.2	<i>Optimizacija metode LC</i>	39
<b>4.3</b>	<b>VALIDACIJA</b>	<b>42</b>
4.3.1	<i>Linearnost</i>	43
4.3.2	<i>Točnost</i>	46
4.3.3	<i>Ponovljivost</i>	48
4.3.4	<i>Območje metode</i>	49
4.3.5	<i>Meja kvantifikacije</i>	50
4.3.6	<i>Selektivnost / specifičnost</i>	50
4.3.7	<i>Uspešnost ekstrakcije</i>	51
4.3.8	<i>Stabilnost</i>	54
<b>4.4</b>	<b>ANALIZA REALNIH PLAZEMSKIH VZORCEV</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>63</b>

## POVZETEK

Ramipril je peroralno aktiven inhibitor ACE. V jetrih se presnavlja v ramiprilat, ki je aktivna oblika zdravilne učinkovine in povzroči znižanje krvnega tlaka preko inhibicije angiotenzinske konvertaze. Uporablja se tudi pri zdravljenju srčnega popuščanja. Za sočasno analizo ramiprila in ramiprilata v plazmi bolnikov s srčnim popuščanjem smo se, zaradi potrebe po nizki meji kvantifikacije in visoki selektivnosti, odločili za uporabo tekočinske kromatografije sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo (LC – MS/MS). Vzorce smo ločevali na koloni Kinetex C18, 50 x 2,10 mm z gradientno mobilno fazo, sestavljeno iz 0,1 % mravljične kisline in acetonitrila. Ramipril in ramiprilat smo iz plazme ekstrahirali s pomočjo ekstrakcije na trdnem nosilcu, pri čemer smo dosegli dobre izkoristke ( $\geq 98,3$  %). Razvito analizno metodo smo validirali in ugotovili, da je za določanje ramiprila in ramiprilata točna, ponovljiva, selektivna in linearna v območju od 0,5 – 200 ng/mL. Oba analita sta kazala tudi dobro stabilnost v različnih razmerah, in sicer po večkratnem zamrzovanju in odtajevanju, na sobni temperaturi ter v vzorčevalniku pri 4 °C. Dokazali smo tudi odsotnost relativnega učinka matrice.

Analizno metodo smo uspešno uporabili za sočasno merjenje plazemskih koncentracij ramiprila in ramiprilata v realnih plazemskih vzorcih pri bolnikih s srčnim popuščanjem.

## ABSTRACT

Ramipril is an orally active ACE inhibitor. Its active metabolite ramiprilat, which is generated in liver, reduces blood pressure through inhibition of angiotensin converting enzyme. Ramipril is used in treatment of heart failure. Because of the need for low limit of quantification and high selectivity, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC – MS/MS) was used for simultaneous analysis of both substances in human plasma of patients with heart failure. The separation of both analytes was performed on Kinetex column C18, 50 x 2,10 mm with a gradient washing, using 0,1 % formic acid and acetonitrile as a mobile phase. Ramipril and ramiprilat were collected with solid phase extraction. The extraction recovery was  $\geq 98,3$  %. The developed method was validated and formed to be accurate, reproducible and selective in the range of linearity from 0,5 to 200 ng/mL of ramipril and ramiprilat. Both analytes showed a good stability in freeze – thaw, short – term and post – preparative stability tests. We have also showed a reduced relative matrix effect.

The method was successfully used for simultaneous measurements of ramipril and ramiprilat concentrations in plasma samples of patients with heart failure.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ACE	Angiotensin Converting Enzyme; encim angiotenzinska konvertaza
APCI	Atmospheric – pressure Chemical Ionization; kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku
AT 1	receptor za angiotenzin II 1
AT 2	receptor za angiotenzin II 2
ESI	Electrospray Ionization; elektrosprejska ionizacija
FDA	Food And Drug Administration; ameriška Agencija za hrano in zdravila
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IS	Interni standard
k	naklon premice
KV	koeficient variance
LC – MS/MS	Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry, tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo
LLOQ	Lower Limit Of Quantification; spodnja meja kvantifikacije
<i>m/z</i>	razmerje med maso in nabojem
MF	mobilna faza
MM	molekulska masa
MRM	Multiple Reaction Monitoring; multirezidualna analiza
n	odsek na ordinati
NYHA	New York Heart Association; Newyorško združenje za srce
QC	Quality Control; kontrola kvalitete
QCh	Quality Control High; kontrola kvalitete pri visoki koncentraciji
QCl	Quality Control Low; kontrola kvalitete pri nizki koncentraciji
QCm	Quality Control Medium; kontrola kvalitete pri srednji koncentraciji
QQQ	Trojni kvadrupol
$r^2$	determinacijski koeficient
RAAS	Renin – Angiotensin – Aldosteron System; reninski – angiotenzinski – aldosteronski sistem
Re	Recovery; uspešnost ekstrakcije



rpm	Revolutions per minute; obrati na minuto
RSD	Relative Standard Deviation; relativni standardni odklon
SD	Standard Deviation; standardni odklon
SPE	Solid Phase Extraction, ekstrakcija na trdnem nosilcu
UV	Ultraviolet; ultravijolično
x	neodvisna spremenljivka (koncentracija)
y	odvisna spremenljivka (odziv)

# 1 UVOD

## 1.1 SRČNO POPUŠČANJE

Srčno popuščanje patofiziološko opredelimo kot stanje, pri katerem srce ne more zagotoviti zadostnega minutnega srčnega iztisa glede na trenutne presnovne potrebe v organizmu ali pa ga lahko zagotovi le ob povišanih polnilnih tlakih in/ali povišani srčni frekvenci.

Do srčnega popuščanja lahko privedejo praktično vse bolezni srca, daleč najpogostejša vzroka zanj pa sta zvišan krvni tlak (arterijska hipertenzija) in ishemična bolezen srca (zoženje koronarnih arterij, zaradi katerega srčna mišica ni zadostno prekrvljena). Med pogostejšimi vzroki zanj so še bolezni srčnih zaklopk, virusna obolenja srčne mišice in kardiomiopatije.

Telo poskuša izboljšati preskrbo s krvjo in kisikom na več načinov. Poveča se delovanje živčno – hormonalnega (nevroendokrinega) sistema. Srčni utrip se pospeši, srčne votline se razširijo, dolgotrajna preobremenitev srca pa privede do zadebelitev sten srca. V ledvicah se zmanjša izločanje vode in soli. Ti odzivi telesa na zmanjšano sposobnost delovanje srca so sprva koristni, saj izboljšajo iztis krvi iz srca, dolgoročno pa so škodljivi, saj se delovanje srca še dodatno poslabša (9).

Srčno popuščanje se odraža v širokem razponu težav. Na začetku je bolnik med telesno obremenitvijo hitro utrujen in težko diha. Ko pa bolezen napreduje, se pojavi kratka sapa (dispneja) že pri hoji po ravnem, nato pa tudi v mirovanju. V pljučih se nabira tekočina, zato je dihanje oteženo, zlasti v ležečem položaju, se pa olajša med sedenjem. Najhujša oblika tega stanja je pljučni edem, ki bolnika življenjsko ogroža. Zaradi nabiranja vode tudi drugod po telesu se pojavijo otekline nog in trebuha, žile na vratu nabreknejo, otekajo pa tudi trebušni organi, kar povzroča slabo prebavo, slab tek in zaradi oteklih jeter tudi trebušno bolečino pod desnim rebrnim lokom (9).

Newyorško združenje za srce (NYHA) je srčno popuščanje razdelilo na štiri stopnje glede na stopnjo izraženosti težav; govorimo o funkcijskih razredih po NYHA, ki so prikazani v Preglednici 1 (2).

Preglednica I: Funkcijski razredi srčnega popuščanja po NYHA (2)

I	Bolniki imajo srčno obolenje, so brez težav pri fizičnih aktivnostih. Normalna fizična aktivnost jim ne povzroča utrujenosti, palpitacij, dispneje ali bolečin za prsnico.
II	Bolniki imajo srčno obolenje, ki se že kaže v blagi omejitvi fizične aktivnosti, in sicer ta privede do utrujenosti, palpitacij, dispneje ali bolečin za prsnico. V mirovanju nimajo težav.
III	Bolniki imajo srčno obolenje, ki se kaže z znatno omejitvijo fizične aktivnosti. Že manjši fizični napor povzroči utrujenost, palpitacije, dispnejo in bolečine za prsnico. V mirovanju nimajo težav.
IV	Bolniki imajo srčno obolenje. Vsaka fizična aktivnost jim povzroča težave, ki so prisotne tudi v mirovanju (utrujenost, palpitacije, dispneja, bolečine za prsnico). Ob vsaki telesni aktivnosti se težave še stopnjujejo.

Zdravljenje srčnega popuščanja je lahko nefarmakološko in farmakološko (3).

Nefarmakološko:

- priporočljivo se je izogibati slanim jedem,
- kontrolirati telesno težo,
- izogibati se vnosu maščob,
- omejiti vnos tekočin,
- opustiti kajenje,
- omejiti uživanje alkohola,
- skrbeti za redno zmerno telesno aktivnost.

Farmakološko zdravljenje poteka z več skupinami zdravil:

- zaviralci angiotenzinske konvertaze (inhibitorji ACE),
- antagonisti receptorjev angiotenzina,
- antagonisti receptorjev beta,
- zaviralci kalcijevih kanalov,
- diuretiki,
- antagonisti aldosterona,
- nitrati,
- digoksin.

Inhibitorje ACE uporabimo pri vseh bolnikih s simptomi srčnega popuščanja, saj izboljšajo delovanje levega prekata, izboljšajo bolnikovo počutje in zmanjšajo umrljivost.

Predstavniki te farmakološke skupine so ramipril, enalapril, lisinopril, perindopril in fosinopril.

Antagonisti receptorjev angiotenzina II (sartani) so po uporabnosti primerljivi z inhibitorji ACE. Priporočajo jih kot dodatek terapiji bolnikom, ki ob terapiji z inhibitorji ACE in beta antagonisti ostajajo simptomatski. Prav tako so prva izbira za zamenjavo, ko bolniki ne prenašajo inhibitorjev ACE. Predstavniki te farmakološke skupine pa so irbesartan, kandesartan, valsartan, losartan in telmisartan.

Antagoniste receptorjev beta uporabljamo tudi pri vseh bolnikih s simptomi srčnega popuščanja, ki so kardiorespiratorno stabilni. Njihovi predstavniki so bisoprolol, nebivolol in karvedilol.

Z antagonisti kalcijevih kanalov preprečujemo vstopanje  $Ca^{2+}$  v srčnomišične celice in celice gladkega mišičja v stenah žil, zato se njegova količina v celicah žilnih sten zmanjša. S tem so te celice manj skrčene, žile se razširijo, krvni tlak pa zniža. Predstavniki te farmakološke skupine so felodipin, nifedipin, nimodipin in diltiazem.

Diuretiki povečujejo volumen izločenega seča s tem pa tudi izločanje natrija skozi ledvica, čemur pa prav tako pasivno sledi povečano izločanje vode skozi ledvica. Posredno se zmanjša volumen krvi, zato krvni tlak pade. Med diureteike sodijo furosemid, torasemid, hidrokloriazid, indapamid in amilorid.

Antagonisti aldosterona kompetitivno zavirajo delovanje tega hormona, s čimer povečujejo natriurezo in diurezo ob sočasnem ohranjajo ravni kalija. Predstavnik te vrste zdravilnih učinkovin je spironolakton.

Nitrati širijo periferne vene, arterije in postkapilarne žile, vključno z velikimi venami. Priporočeni so kot dodatek terapiji bolnikom, ki ob zdravljenju z inhibitorji ACE, beta antagonisti, sartani in antagonisti aldosterona ostajajo simptomatski. So tudi prva izbira zamenjave, kadar bolniki omenjenih zdravil ne prenašajo. Njihova predstavnika sta glicerilnitrat in izosorbidmononitrat.

Digoksine uporabljamo pri bolnikih s simptomatskim srčnim popuščanjem in atrijsko fibrilacijo, saj umirijo pospešeno frekvenco prekatov. Njihov predstavnik je metildigoksin (3).

## 1.2 RENINSKI – ANGIOTENZINSKI – ALDOSTERONSKI SISTEM

Ramipril spada v skupino inhibitorjev ACE. ACE je peptidaza, vezana na membrano endotelijskih celic, še natančneje karboksipeptidaza, ki odcepi dve aminokislini z N - konca angiotenzina I tako, da nastane oktapeptid angiotenzin II. Njeno aktivno mesto vsebuje cinkov atom. ACE je del sistema renin – angiotenzin – aldosteron (sistem RAAS). Sistem RAAS (shematsko je prikazan na sliki 1) je eden izmed pomembnejših mehanizmov uravnavanja volumna krvi in s tem tudi krvnega tlaka. Renin je proteolitični encim, ki se nahaja pretežno v ledvicah, najdemo pa ga tudi v možganih, srcu in nadledvični žlezi. Iz citoplazemskih veziklov se lahko ob določenem stimulusu sprosti v krvni obtok. Tak dražljaj predstavljata npr. zmanjšan intrarenalni arterijski tlak ali premajhen vnos natrijevih in kloridnih ionov. Osnovna funkcija renina je razcep angiotenzinogena, beljakovine, ki nastaja v jetrih. Produkt reakcije je angiotenzin I, ki nima pomembnejše vloge v organizmu. Pomembna je njegova naslednja pretvorba v angiotenzin II, s pomočjo ACE. Ta oktapeptid deluje preko membransko vezanega angiotenzinskega receptorja 1 (AT1), ki je sklopljen s proteinom G in preko angiotenzinskega receptorja 2 (AT2). Poleg tega inhibitorji ACE potencirajo delovanje bradikina, saj so podobni kininazi, ki katalizira njegov razpad.

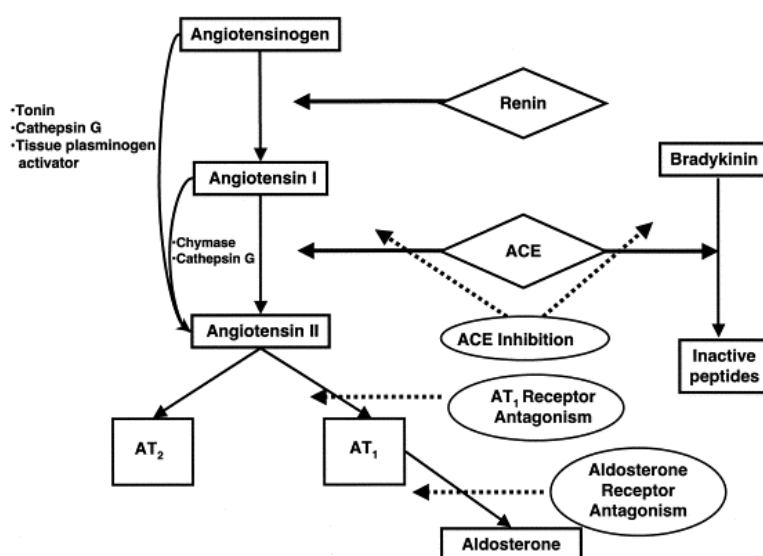
Angiotenzin II se metabolizira v jetrih in ledvicah. Aminopeptidazi A in N z njegovega N-konca zaporedoma odstranita po eno aminokislino, pri čemer nastaneta angiotenzin III in IV. Prvi, stimulira sekrecijo aldosterona in preko delovanja na centralni živčni sistem povzroča občutek žeje. Angiotenzin IV pa naj bi stimuliral sproščanje inhibitorja plazminogenškega aktivatorja I iz žilnega endotelija, vendar ta funkcija še ni povsem pojasnjena (18, 19).

Angiotenzin I lahko nastaja tudi brez prisotnosti renina, in sicer pod vplivom encimov tonina ali katepsina. Prav tako lahko brez prisotnosti ACE nastaja tudi angiotenzin II, in sicer pod vplivom tripsina, katepsina ali kinaze v srcu (29).

Fiziološki učinki delovanja angiotenzina II se kažejo v kardiovaskularnem sistemu, centralnem živčnem sistemu, ledvicah in skorji nadledvičnice.

Angiotenzin II je vazokonstriktor, ki deluje neposredno na arteriole in povzroči dvig krvnega tlaka. Stimulira tudi celično rast v steni levega ventrikla in arterij. V centralnem živčnem sistemu vpliva na kardiovaskularni center in vzpodbuja izločanje noradrenalina iz

simpatičnih živčnih končičev, s čimer poveča neposredni učinek angiotenzina II na arteriole, poleg tega pa se poveča tudi kontraktlnost srca. V hipotalamusu aktivira mehanizem nastanka občutka žeje. V ledvicah angiotenzin II preko vazokonstrikcije vpliva na ledvični krvni obtok in tako zmanjša hitrost glomerulne filtracije. Poveča se tudi hitrost reabsorbcije natrija v proksimalnih tubulih. V skorji nadledvičnice vzpodbuja sproščanje mineralokortikoida aldosterona. Ta poveča izločanje kalija in reabsorbcijo natrija v distalnem tubulu. Zadrževanje natrija v telesu posledično povzroči zadrževanje vode, kar v končni fazi poveča volumen ekstracelularne tekočine (18, 19).

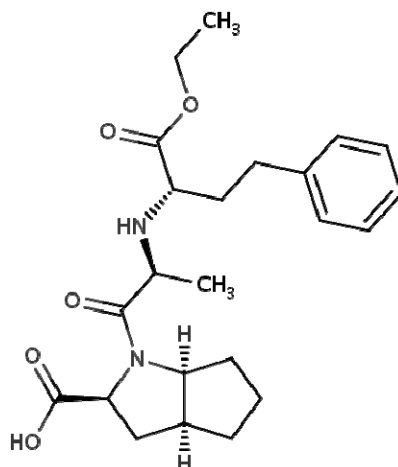


Slika 1: Shematski prikaz sistema renin – angiotenzin – aldosteron (6)

### 1.3 RAMIPRIL IN RAMIPRILAT

Ramipril je peroralno aktiven inhibitor ACE, ki je predzdravilo in se uporablja pri vseh oblikah hipertenzije, srčnem popuščanju, tudi pri bolnikih po miokardnem infarktu, ki imajo klinično dokazano srčno popuščanje. Njegova aktivna oblika je ramiprilat, ki nastane s hidrolizo etilnega estera v jetrih (19).

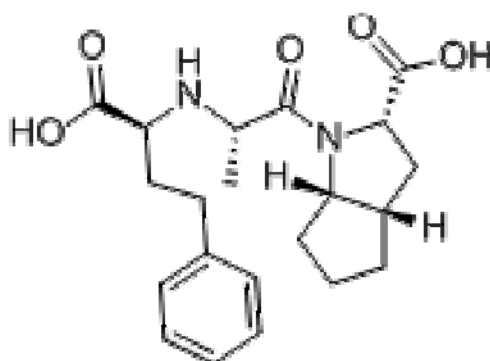
Preglednici II in III prikazujeta fizikalno - kemijske lastnosti ramiprila in ramiprilata, sliki 2 in 3 pa njuni kemijski formuli.



Slika 2: Ramipril (7)

Preglednica II: Fizikalno - kemijske lastnosti ramiprila (7,23)

<b>IUPAC ime</b>	(2 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,6 <i>aS</i> )-1-[(2 <i>S</i> )-2-{(2 <i>S</i> )-1-etoksi-1-okso-4-fenilbutan-2-il}amino]propanoil]-oktahidrociklopenta[ <i>b</i> ]pirol-2-karboksilna kislina
<b>Molska masa</b>	416,51 g/mol
<b>Molekulska formula</b>	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
<b>Tališče</b>	109°C
<b>pKa</b>	pKa <sub>1</sub> = 3,1 pKa <sub>2</sub> = 5,6
<b>log P</b>	1,47



Slika 3: Ramiprilat (8)

Preglednica III: Fizikalno - kemijske lastnosti ramiprilata (8)

<b>IUPAC ime</b>	(2S,3aS,6aS)-1-((S)-N-((S)-1-karboksi-3-fenilpropil)alanil)tetrahidrociklopenta[b]pirol-2-karboksilna kislina
<b>Molska masa</b>	388,46 g/mol
<b>Molekulska formula</b>	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
<b>Tališče</b>	139-141°C
<b>pKa</b>	pKa <sub>1</sub> = 2,2 pKa <sub>2</sub> = 3,4 pKa <sub>3</sub> = 8,0
<b>log P</b>	3,32

### 1.3.1 Farmakodinamične lastnosti

Ramiprilat je močan inhibitor ACE z dolgotrajnim delovanjem. Posledica zaviranja ACE je zmanjšanje koncentracije angiotenzina II, povečanje plazemske reninske aktivnosti, potenciranje učinka bradikinina (suh in dražeč kašelj) in zmanjšanje izločanja aldosterona. Slednje lahko povzroči povečanje koncentracije serumskega kalija.

Antihipertenzivni in hemodinamični učinki ramiprila pri bolnikih s povečanim krvnim tlakom so posledica razširitve uporovnih žil in zmanjševanja celotnega perifernega upora, kar postopno znižuje povišan krvni tlak. Srčna frekvenca ostane pri tem navadno nespremenjena. Med podaljšanim zdravljenjem se zmanjša hipertrofija levega prekata, ne da bi se pri tem poslabšalo delovanje srca.

Hipotenzivni učinek enkratnega odmerka se pojavi 1 do 2 uri po zaužitju, doseže vrh po 3 do 6 urah in navadno traja 24 ur. Običajni dnevni odmerki se gibljejo od 1,25 mg do 10 mg (5).

Glede na izsledke kliničnih študij, ramipril zmanjša umrljivost in napredovanje v hude oblike srčnega popuščanja pri bolnikih, pri katerih je bilo evidentirano srčno popuščanje kmalu po miokardnem infarktu (1).

Po podatkih iz literature, ramipril pomembno zmanjša pogostost srčnega infarkta, možganske kapi in srčno-žilne smrti pri bolnikih s povečano srčno-žilno ogroženostjo zaradi žilnih bolezni (npr. razvite koronarne bolezni srca, anamneze možganske kapi ali periferne žilne bolezni) ali zaradi sladkorne bolezni, ki imajo vsaj en dodatni dejavnik



tveganja (mikroalbuminurijo, hipertenzijo, zvišano koncentracijo celotnega holesterola, nizko koncentracijo lipoproteinov velike gostote, kajenje) (5).

Najpogostejši neželeni učinki ramiprila so:

- glavobol ali utrujenost,
- omotica, omedlevica,
- nenormalno nizek krvni tlak (hipotenzija),
- suh dražeč kašelj, vnetje obnosnih votlin (sinuzitis) ali bronhitis, kratka sapa,
- bolečine v želodcu ali črevesju, driska, prebavne težave, bruhanje,
- izpuščaj na koži,
- bolečine v prsih,
- krči ali bolečine v mišicah,
- zvišana raven kalija v krvi. (5)

### 1.3.2 Farmakokinetične lastnosti

Ramipril se iz prebavil hitro absorbira. Njegova absorpcija je 50- do 60-odstotna in je hrana ne ovira. Najvišjo serumsko koncentracijo doseže v eni uri po zaužitju. Razpolovna doba izločanja je ena ura. Absolutna biorazpoložljivost ramiprila in ramiprilata je 28% oziroma 44%, kadar primerjamo peroralno in intravensko aplikacijo (7).

Ramipril se presnavlja v jetrih. Njegov glavni presnovek je ramiprilat, ki je kar 6-krat močnejši zaviralec angiotenzinske konvertaze kot ramipril. Poleg ramiprilata nastajajo tudi neaktivni presnovki (diketopiperazinijev ester in kislina ter glukoronidi).

Ramiprilat doseže največjo serumsko koncentracijo v 2 do 4 urah po zaužitju, stacionarno serumsko koncentracijo pa po 4 dneh (5).

Na beljakovine v serumu se veže približno 73 % ramiprila in 56 % ramiprilata (7). Ramipril in ramiprilat se večinoma izločata s sečem (okrog 60 %) predvsem v obliki presnovkov, s fecesom pa se izloči 40 %. Manj kot 2 % zaužitega odmerka se izloči v obliki nespremenjenega ramiprila (5).

Koncentracija ramiprilata v plazmi se zmanjšuje v več fazah. Zaradi močne vezave na ACE in počasne disociacije z encima ima ramiprilat dolgo terminalno eliminacijsko fazo pri zelo nizki koncentraciji v plazmi. Njegova terminalna razpolovna doba po zaužitem terapevtskem odmerku ramiprila je 13 do 17 ur.

Pri bolnikih z ledvično okvaro je izločanje ramiprila, ramiprilata in njunih presnovkov upočasnjeno, zato ramipril odmerjamo glede na ledvično delovanje.

Pri bolnikih z jetrno okvaro je, verjetno zaradi zmanjšane aktivnosti jetrnih esteraz, lahko upočasnjena tudi presnova ramiprila v ramiprilat in posledično zvišana serumska koncentracija ramiprila (5).

#### **1.4 ANALIZNE METODE ZA DOLOČEVANJE RAMIPRILA IN RAMIPRILATA V PLAZMI**

Za določanje ramiprila in ramiprilata v bioloških vzorcih so na voljo predvsem metode ki temeljijo na tekočinski kromatografiji sklopljeni s tandemsko masno spektrometrijo – LC – MS/MS (4, 11 - 13), redkeje pa na HPLC z UV detekcijo (10, 17). Metoda LC – MS/MS je veliko uporabnejša, saj nam omogoča precej nižje meje kvantifikacije kot HPLC –UV. Spodnja meja kvantifikacije s HPLC – UV je namreč 0,5 µg/mL (26).

Dosedaj uporabljene analizne metode imajo zelo široka koncentracijska območja. Spodnja meja kvantifikacije za ramipril in ramiprilat je tako med 0,1 in 0,5 ng/ml. Njuna zgornja meja kvantifikacije pa se giblje med 80 in 250 ng/ml (4, 11 – 13). Takšne koncentracije ramiprila in ramiprilata namreč pričakujemo po zaužitju enkratnega 5 mg ali 10 mg odmerka zdravila (4, 11, 14, 15). Koncentracije ramiprilata pri bolnikih s srčnim popuščanjem v stacionarnem stanju se gibljejo med 26 in 36 ng/mL, in sicer štiri ure po zaužitju odmerka, ko so koncentracije ramiprilata najvišje (28).

Metode, s katerimi lahko dosežemo tako nizko mejo kvantifikacije pri kromatografiji, največkrat temeljijo na uporabi masnega detektorja. Masni spektrometer deluje na principu ionizacije molekul in ločitve ter identifikacije nastalih ionov glede na razmerje njihove mase in naboja ( $m/z$ ). Sistemi LC – MS/MS so sestavljeni iz tekočinskega kromatografa, ionizacijskega vira, ki ustvarja pozitivno ali negativno nabite ione, masnega analizatorja (razvrščevalca ionov) ter detektorja ionov (23, 24). Izbiramo lahko med več vrstami ionizacijskih virov in masnih analizatorjev.

Priprava bioloških vzorcev je odvisna od vrste uporabljene analizne metode in detektorja. Osnovni koraki, ki jih lahko vključimo v ta proces so homogeniziranje vzorca, dodatek internega standarda (IS), ekstrakcija tekoče/tekoče ali ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE), sušenje in rekonstitucija oz. ponovo raztapljanje vzorca. Najpogosteje uporabljamo SPE, ki daje tudi dobre izkoristke (> 80%), tako za ramipril, kot tudi za ramiprilat (4, 11, 14, 15). Med že poznanimi metodami zasledimo tudi uporabo različnih internih standardov, med

katerimi se uporabljajo tudi drugi inhibitorji ACE (najpogosteje enalapril in enalaprilat) ter devterirana ramipril in ramiprilat, ki smo ju uporabili tudi mi (4, 12 - 14).

### *Metode ionizacije*

Najbolj uporabljani metodi ionizacije sta elektrorazprševalna ionizacija (ESI) in kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku (APCI).

Pri metodi ESI poteka ionizacija med prehodom analita skozi cevko, ki je pod električno napetostjo. Analit z mobilno fazo razpršujemo v prostor z atmosferskim tlakom v prisotnosti elektrostatičnega polja in segretega plina. Elektrostatično polje povzroči ionizacijo molekul, plin pa odparitev topila. Pri tem pride do desorpcije ionov v plinasto fazo (24). Opisana metoda je primerna tako za velike molekule (proteine, peptide) kot tudi za manjše molekule. Tudi mi smo uporabili to metodo.

Pri metodi APCI potuje analit z mobilno fazo skozi segreti vmesnik, pri čemer visoka temperatura upari tekočino. Elektroda ionizira molekule topila, njegovi ioni pa potem svoj naboj prenesejo na molekule analita s pomočjo kemijske reakcije. Metodo APCI lahko uporabimo tudi za analizo manjših molekul, ni pa primerna za termolabilne učinkovine (23,25).

### *Masni analizatorji*

Masni analizatorji naj bi bili sposobni zaznati zelo majhne razlike v razmerjih  $m/z$  med različnimi ioni in zagotoviti pretok zadostnega števila ionov. Analizatorji, ki se najpogosteje uporabljajo so kvadrupolni masni analizatorji, masni analizatorji na osnovi časa preleta in masni analizatorji z ionsko pastjo (24, 25).

Kvadrupolni masni analizatorji so sestavljeni iz štirih kovinskih palic, razporejenih v kvadrat. Vzdolž njih potujejo ioni analita. Palice so pod električno napetostjo tako, da ustvarjajo elektromagnetno polje, ki določa, katera razmerja  $m/z$  ionov bodo prešla filter. Pogosto se pri analizah MS/MS uporabljajo trije zaporedno vezani kvadrupoli (trojni kvadrupol). Uporabili smo ga tudi mi.

Pri masnih analizatorjih na osnovi časa preleta (time of flight analyser – TOF) električna napetost povzroči tok ionov skozi cevko. Čas preleta iona je premosorazmeren kvadratnemu korenu razmerja  $m/z$ . Slabost teh analizatorjev sta slabša ločljivost in občutljivost.

Masni analizator z ionsko pastjo (Ion Trap analyser – IT) vsebuje obročasto elektrodo, ki v komori ustvari tridimenzionalno elektromagnetno polje v katero se ujamejo ioni. Glede na razmerje  $m/z$  določimo električno napetost, s tem pa tudi kateri ioni bodo ujeti. Selektivni izpust ionov dosežemo z dodatnim elektromagnetnim poljem. Prednost IT analizatorjev je v tem, da lahko snemamo spektre iona skozi več generacij.

Mi smo uporabili tekočinski kromatograf, sklopljen z masnim detektorjem s trojnim kvadrupolom (QQQ) z načinom ionizacije ESI. Za masne detektorje tega tipa sta značilni visoka selektivnost in občutljivost. Za kvantifikacijo z masnim spektrometrom se uporablja predvsem takoimenovana multirezidualna analiza (MRM). Gre za kromatografsko ločbo analitov in detekcijo kromatografskih vrhov z masnim detektorjem, ki predhodno razbije analite in detektira njihove hčerinske ione (23).

Potek kvantifikacije na masnem spektru z MRM:

Prvi masni filter oz. kvadrupol prepušča starševske ione z določeno vrednostjo  $m/z$ . V drugem kvadrupolu pa poteka njihova fragmentacija z inertnim plinom (dušik ali argon) na več hčerinskih ionov. Vzporedno tretji kvadrupol prepušča eno ali največ dve vrsti starševskemu ionu pripadajočih hčerinskih ionov. Odziv je tako odvisen od števila hčerinskih ionov, ki zadanejo elektronsko pomnoževalko (23).

## 2 NAMEN DELA

Ramipril je peroralno aktiven inhibitor ACE. V jetrih se presnavlja v ramiprilat, ki je aktivna oblika zdravilne učinkovine in povzroči znižanje krvnega tlaka preko inhibicije angiotenzinske konvertaze.

Analizne metode za določevanje koncentracije ramiprila in ramiprilata v plazmi so pomembne za spremljanje koncentracij obeh analitov v plazmi bolnikov, kar omogoča potencialno spremembo odmerjanja. Potrebujemo tako analizo metodo, ki bo primerna za sočasno določanje dovolj nizkih koncentracij ramiprila in ramiprilata. Do sedaj objavljene analizne metode omogočajo merjenje koncentracije obeh omenjenih analitov, temeljijo pa na različnih metodah priprave vzorcev in detekcije.

Namen naše diplomske naloge je bil razviti in validirati analizo metodo za sočasno določanje plazemskih koncentracij ramiprila in ramiprilata s pomočjo tekočinske kromatografije, sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo. Plazemske vzorce za analizo smo pripravili s pomočjo ekstrakcije na trdnem nosilcu. Naš cilj je bil določitev optimalnih pogojev ekstrakcije in analize, ki bi omogočali točno, hitro in enostavno določanje analitov.

Z ustrezno optimizirano in validirano metodo smo nato določili plazemske koncentracije ramiprila in ramiprilata v plazemskih vzorcih bolnikov, ki so že dalj časa redno jemali to zdravilo in so imeli njegove plazemske koncentracije že v stacionarnem stanju. Koncentraciji obeh analitov smo merili v vzorcih pri času  $t = 0$  (tik preden je bolnik zaužil redni odmerek zdravilne učinkovine) ter po eni, dveh, treh, štirih in petih urah po njegovem zaužitju.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Biološki material

##### *Plazma*

Uporabljali smo človeško plazmo (antikoagulant EDTA), odvzeto na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani. Uporabljali smo različne plazme, ki smo jih do analize hranili v zmrzovalniku na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Realne vzorce bolnikov smo dobili iz raziskave z naslovom Vpliv sprememb v telesni sestavi in kaheksije na farmakokinetične parametre bisoprolola in ramiprila ter ocena ledvične funkcije pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem, ki se izvaja v Kliniki Golnik, na Kliničnem oddeleku za pljučne bolezni in alergologijo.

Podatki o kontrolnih plazemskih vzorcih:

*Plazma 1:* odvzem 20.9.2011 (št.: 1979776)

*Plazma 2:* odvzem 23.2.2011 (št.: 1878738)

*Plazma 3:* odvzem 10.5.2011 (št.: 1866003)

*Plazma 4:* odvzem 16.7.2012 (št.: 2103144)

*Plazma 5:* odvzem 16.7.2012 (št.: 2103150)

Pred delom smo kontrolno plazmo najprej odmrznili na sobni temperaturi in jo premešali, s čimer smo zagotovili boljšo homogenost plazemskih vzorcev.

Vzorce bolnikov smo hranili pri temperaturi  $-70^{\circ}\text{C}$ . Pred delom smo jih prav tako odmrznili na sobni temperaturi in jih premešali.

#### 3.1.2 Standardi

- RAMIPRIL ( $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$ ); MM = 416,51 g/mol (Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, Združeno Kraljestvo)
- RAMIPRILAT ( $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$ ); MM = 388,46 g/mol (Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, Združeno Kraljestvo)

- INTERNI STANDARD ZA RAMIPRIL: Ramipril – d<sub>5</sub> (C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>D<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>);  
MM = 421.54 g/mol (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornija, ZDA)
- INTERNI STANDARD ZA RAMIPRILAT: Ramiprilat – d<sub>5</sub> (C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>D<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>);  
MM = 393.49 g/mol (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornija, ZDA)

### 3.1.3 Reagenti in topila

- Klorovodikova kislina (HCl) Titrisol<sup>®</sup> za pripravo 1M raztopine (Merck, KGAA, Darmstadt, Nemčija)
- Metanol Chromasol V<sup>®</sup> (CH<sub>3</sub>OH); MM = 32,04 g/mol (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- 25 % vodna raztopina amonijaka (NH<sub>3</sub>); MM = 17,03 g/mol (Panreac Quimica, S.A.U., Barcelona, Španija)
- Acetonitril Chromasol V<sup>®</sup> (CH<sub>3</sub>CN); MM = 41,05 g/mol (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Amonijev acetat (NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COOH); MM = 77,08 g/mol (Merck, KGAA, Darmstadt, Nemčija)
- Pufrske raztopine pH = 8, pH = 10 (Kefolab, Ljubljana, Slovenija)
- Mravljična kislina 98 – 100 % Suprapur<sup>®</sup> (HCOOH); MM = 46,03 g/mol (Merck KGAA, Darmstadt, Nemčija)
- Bidestilirana voda – voda mili-Q, pridobljena z aparatom Mili-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, ZDA), s specifično upornostjo 18 MΩcm in celokupnim organskim ogljikom (TOC) 5 ppb, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana

### 3.1.4 Naprave in pribor

- HLADILNIK 4 °C z zamrzovalnikom – 20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- HLADILNIK 4 °C (LTH, Škofja Loka, Slovenija)
- ZAMRZOVALNIK -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- ZAMRZOVALNIK -70 °C MDF – U50V (Sanyo Electric Bimedocal, Japonska)
- TEHTNICA AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- TEHTNICA XP 105 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

- pH METER MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- CENTRIFUGA EPPENDORF 5415 R (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- MEŠALNIK LAB DANCER (IKA<sup>®</sup>, Staunton, Nemčija)
- MEŠALNIK VIBROMIX 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- ULTRAZVOČNA KADIČKA BANDELIN SONOREX DIGITAL 10 P (Schalltec, Mörfelden – Waldorf, Nemčija)
- ELEKTROMAGNETNO MEŠALO ROTAMIX 550 MMH (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- POLAVTOMATSKE PIPETE 2 -20 µL, 20 – 200 µL, 200 – 1000 µL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- PLASTIČNE EPICE oz. MIKROCENTRIFUGIRKE - PLASTIBRAND<sup>®</sup> (Brand, Nemčija)
- SPE APARATURA: Machery – Nagel, vakuumaska kadička s pokrovi in nastavkom za kolone SPE (Machery – Nagel, Düren, Nemčija)  
Vakuumska črpalka DOA – P504 – BN (Gast, Michigan, ZDA)
- Kolona SPE: Strata X – C, 33µ, 60 mg/3 mL, Polymeric Strong Cation, 8B – SO29 – UBJ (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- TurboVap<sup>®</sup> LV (Caliper, Hopkinton, MA, ZDA)
- Predkolona HPLC: C18, 4 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- Kolone HPLC:
  - Gemini C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
  - Gemini C6 – Phenyl, 150 x 4,6 mm, 3 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- Sistem HPLC: Agilent Technologies 1100 in 1200 series z UV detektorjem (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
- Kolona LC – MS/MS: Kinetex C18, 50 x 2,10 mm, 2,6 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- Predkolona LC – MS/MS: Kinetex C18, 4 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)



- Sistem LC – MS/MS: HPLC Agilent Technologies 1290 Infinity, sklopljen z Agilent Technologies 6460 Triple Quad masnim spektrometrom (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
- STEKLENI INVENTAR: merilne bučke, čaše, tehtiči, merilni valji, palčke za mešanje, vialo, inserti za vialo
- OSTALI INVENTAR: spatule, nastavki za pipete, Parafilm<sup>®</sup>M

## 3.2 METODE

Pri razvoju in optimizaciji naše analizne metode smo si pomagali z že objavljenimi metodami (11, 12, 14, 15, 18). Analizno metodo smo najprej razvili na sistemu HPLC – UV, pri čemer smo preverili uspešnost ekstrakcijske metode. Delo na aparaturi HPLC – UV je tudi dostopnejše in cenejše. Uporabili smo z vzorce z višjo koncentracijo analitov in brez IS, z razliko od kasnejših analiz s sistemom LC - MS/MS. V nadaljevanju dela smo želeli analizirati plazemske vzorce bolnikov z realnimi plazemskimi koncentracijami ramiprila in ramiprilata, ki so dokaj nizke, zato smo razvili in validirali občutljivejšo metodo LC – MS/MS.

### 3.2.1 Priprava osnovnih topil, raztopin in pufrov

*Osnovno raztopino ramiprila* s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili v 1,5 - mL mikrocentrifugirkah. V vsako mikrocentrifugirko smo zatehtali približno 1 mg učinkovine in jo raztopili v takšnem volumnu metanola, da smo dobili želeno koncentracijo.

*Osnovno raztopino ramiprilata* s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili na enak način.

*Delovna raztopina ramiprila in ramiprilata:* Po 1000  $\mu$ L vsake od osnovnih raztopin ramiprila in ramiprilata smo odpipetirali v ustrezen vsebnik in ju razredčili z bidestilirano vodo do 5 mL. Tako smo dobili želeni delovni koncentraciji ramiprila in ramiprilata, in sicer po 200  $\mu$ L/mL. Nato smo obe raztopini zmešali skupaj v razmerju 1 : 1 tako, da smo dobili delovno raztopino ramiprila in ramiprilata, v kateri sta bila analita v koncentracijah po 100  $\mu$ L/mL.

*Osnovno raztopino internega standarda (IS) ramiprila,* 1 mg/mL smo pripravili v mikrocentrifugirkah, kamor smo zatehtali približno 1 mg IS in ga raztopili v metanolu, do

želene

koncentracije.

*Osnovno raztopino internega standarda (IS) ramiprilata*, 1 mg/mL smo pripravili na enak način kot osnovno raztopino IS za ramipril.

*Delovna raztopina internih standardov*: V bučko smo odpipetirali 500  $\mu$ L osnovne raztopine IS ramiprila in jo z bidestilirano vodo dopolnili do 5 mL. Dobili smo raztopino s koncentracijo 100  $\mu$ L/mL, ki smo jo nato redčili še 5-krat do koncentracije 20  $\mu$ L/mL. Nato smo v drugo bučko prav tako odpipetirali 500  $\mu$ L osnovne raztopine IS ramiprilata in jo dopolnili z bidestilirano vodo do 2,5 mL ter tako pripravili raztopino s koncentracijo 200  $\mu$ g/mL.

Obe raztopini IS smo med seboj premešali v razmerju 1 : 1 (v/v) ter tako dobili končni koncentraciji 10  $\mu$ g/mL IS ramiprila in 100  $\mu$ g/mL IS ramiprilata.

*Amonijev pufer s pH 9 za vodni del mobilne faze pri HPLC – UV*: V 500 mL bučko smo odpipetirali 850  $\mu$ L 25 % vodne raztopine amonijaka in jih dopolnili z bidestilirano vodo do oznake. S pomočjo predhodno umerjenega pH metra smo izmerili vrednost pH in dodajali 1 M HCl do zelene vrednosti pH 9, nato pa pufer razplinili na ultrazvočni kadički. Pufer je predstavljal vodni del mobilne faze, za njen organski del pa smo uporabili metanol ali acetonitril.

*0,1 M in 0,2M HCl*: Obe raztopini HCl smo pripravili z ustreznim redčenjem 1 M HCl z bidestilirano vodo.

*5 % raztopina amonijaka v metanolu za ekstrakcijo*: 25 % vodno raztopino amonijaka smo v digestoriju 5 – krat redčili z metanolom in dobro premešali.

*Topilo za redčenje in rekonstitucijo*: Pripravili smo ga iz 5 mM raztopine amonijevega acetata v vodi in metanola, v razmerju 75 : 25 (v/v).

*Raztopina 5 mM amonijevega acetata*: Na tehtiču smo zatehtali približno 38,5 mg amonijevega acetata in ga prenesli v 100 mL merilno bučko, jo dopolnili z bidestilirano vodo do oznake in vsebino dobro premešali.

Nato smo z merilnim valjem odmerili 75 mL pripravljene raztopine 5 mM amonijevega acetata in jo prelili v čašo. V drugi merilni valj smo nalili 25 mL metanola in ga nato prilili

amonijevem acetatu. Nastalo raztopino smo dobro zmešali.

*Vodni del mobilne faze za LC – MS/MS (mobilna faza A):* V 500 mL vsebnik smo najprej nalili 500 mL bidestilirane vode in ji nato dodali 500  $\mu$ L mravljične kisline. Vse skupaj smo dobro premešali in dobili raztopino s pH približno 3.

Osnovne raztopine učinkovin, internih standardov, delovne raztopine ramiprila in ramiprilata ter delovne raztopine IS smo shranjevali v hladilniku, pri temperaturi 4 °C in jih uporabljali največ en mesec. Vse ostale raztopine smo pripravljali vsak dan sproti.

### **3.2.2 Priprava plazemskih vzorcev**

*Priprava plazemskih vzorcev za razvoj analizne metode:* V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 450  $\mu$ L slepe (kontrolne) plazme in ji dodali 25  $\mu$ L ustrezno redčene (s topilom za redčenje in rekonstitucijo) delovne raztopine ramiprila in ramiprilata ter 25  $\mu$ L delovne raztopine IS. Plazemskemu vzorcu smo nato dodali še 500  $\mu$ L 0,2 M HCl. Mešanico smo intenzivno premešali (vorteksirali) 1 minuto in jo nato še 5 minut centrifugirali na 13200 rpm (maksimalni obrati centrifuge), pri temperaturi 4 °C. Za ekstrakcijo smo uporabili 900  $\mu$ L supernatanta plazemskega vzorca.

#### **3.2.2.1 Ekstrakcija**

Ekstrakcija smo izvedli na trdnem nosilcu (SPE). Pri postopku SPE gre za princip večje afinitete vezave analitov v vzorcu na adsorbent, kot pa jo imajo morebiti prisotne nečistote. S spiranjem odplaknemo nečistote v odpad, v naslednji stopnji pa z močnejšim topilom izperemo analite in jih nato uporabimo za nadaljne kromatografske meritve. Za ekstrakcijo smo uporabili kolono Strato X – C, namenjeno ionsko - izmenjevalni ekstrakciji na trdnem nosilcu. Gre za izrazito kationski izmenjevalni sorbent, ki omogoča popolno zadrževanje učinkovin s pKa vrednostmi manj kot 10,5 (27). Za SPE z močnim kationskim delovanjem smo se odločili na podlagi vrednosti pKa in log P preučevanih spojin (preglednici II in III, poglavje 1.3. Ramipril in ramiprilat). Pri tem smo uporabili program Strata Sample Preparation Method Development Software (Phenomenex), ki nam je prikazal tudi potek ekstrakcije.

Potek ekstrakcije:

- *Kondicioniranje*: 2 mL metanola

Kondicioniranje je potekalo pri podtlaku 5 mm Hg, ki smo ga ustvarili z vakuumsko črpalko.

- *Ekvilibracija*: 2 mL 0,1 M HCl

Prav tako smo jo izvedli pri podtlaku 5 mm Hg.

- *Nanos vzorca*: nanесли smo 900  $\mu$ L supernatanta plazemskega vzorca

Podtlak smo povečali na 10 mm Hg.

- *Spiranje*: 2 mL 0,1 M HCl in 2 mL metanola

Spiranje smo izvedli pri podtlaku od 5-7 mm Hg.

- *Elucija*: 1,5 mL 5 % amonijaka v metanolu

Pred izpiranjem smo odpadne zamenjali z novimi mikrocentrifugirkami in vanje zbirali eluate.

### 3.2.2.2 Sušenje in rekonstitucija

Eluat smo sušili v mikrocentrifugirkah z aparatom TurboVap<sup>®</sup> z dušikom in sicer na 60 °C in pri tlaku 10 – 15 kPa približno 30 minut. Suhemu ostanku smo dodali 200  $\mu$ L topila za redčenje in rekonstitucijo (75 % 5 mM amonijevega acetata in 25 % metanola). Raztopino smo intenzivno mešali 1 minuto. Iz homogeniziranega vzorca smo nato odpipetirali 150  $\mu$ L za nadaljno analizo.

### 3.2.3 Razvoj metode z uporabo HPLC – UV

*Izbira kolone*

Preizkusili smo dve različni koloni, ena je bila reverzno - fazna, druga pa fenil heksilna.

- Gemini C18 (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m)
- Gemini C6 – Phenyl (150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m)

Preučevali smo vpliv posamezne kolone na čas (dolžino) analize, na obliko kromatografskih vrhov in na ločbo vrhov naših analitov od ostalih sestavin plazme.

*Izbira optimalne mobilne faze*

Za vodni del mobilne faze smo uporabili amonijev pufer s pH 9. Odvisno od uporabljene kolone pa smo spreminjali organski del mobilne faze. Ta je bila v primeru reverzno - fazne kolone acetonitril, v primeru fenil heksilne pa metanol.

Mobilni fazi za reverzno - fazno kolono:

- MF 1: pufer : acetonitril = 70 : 30 (v/v)
- MF 2: začnemo z razmerjem pufer : acetonitril = 75 : 25 (v/v), nato gradientno od 0 – 10 minut, acetonitril od 25 – 40 %

Mobilni fazi za fenil heksilno kolono:

- MF 3: pufer : metanol = 45 : 55 (v/v)
- MF 4: pufer : metanol = 50 : 50 (v/v)

#### *Izbira pretoka mobilne faze*

Preizkusili smo različne pretoke mobilne faze, in sicer od 0,8 – 1,0 mL/min.

#### *Izbira temperature kolone*

Preizkusili smo temperaturo 50 °C.

#### *Volumen injiciranja*

Volumen injiciranja je bil 20 µL.

#### *Valovna dolžina detekcije*

Za detekcijo smo izbrali valovno dolžino 215 nm.

### **3.2.4 Razvoj metode z uporabo LC – MS/MS**

Za analizo in detekcijo smo uporabili masni analizator Agilent 6460 s trojnim kvadrupolnim MS/MS analizatorjem.

Nekatere parametre smo določali brez kolone, z neposrednim dovajanjem vzorca v MS del, druge pa smo optimizirali s pomočjo ustrezne kolone.

#### *Optimizacija metode MS/MS*

Spreminjali smo različne parametre sistema MS/MS:

- optimizacijo prehodov MRM za ramipril, ramiprilat, ramipril - d<sub>5</sub> in ramiprilat - d<sub>5</sub>,
- vrednost fragmentorja,
- kolizijsko energijo,
- temperaturo sušilnega plina,



- napetost na kapilari,
- napetost na šobi (ang. nozzle voltage),
- temperaturo pretoka plina Jetstream<sup>®</sup>,
- razdelilni čas oz. čas zadrževanja na eni masi (ang. dwell time).

#### *Optimizacija metode LC*

Izbrali smo kolono Kinetex C18, 50 x 2,10 mm, 2,6 µm s predkolono Kinetex C18, 4 x 2 mm. Za mobilno fazo A smo uporabili 0,1 % mravljično kislino, za mobilno fazo B pa 98 % acetonitril. Tekom analize smo spreminjali predvsem gradientni program mobilne faze. Pri tem smo preučevali tako vplive kolone kot uporabljene mobilne faze na ločevanje kromatografskih vrhov analitov, njihovo resolucijo in čas analize. Poleg najustrežnejšega gradienta mobilne faze smo določili tudi njen optimalen pretok in temperaturo kolone.

#### **3.2.5 Validacija metode**

Validacija je dokumentiran postopek preizkušanja in potrjevanja, da uporabljena metoda z veliko gotovostjo zagotavlja rezultate, ki točno odražajo lastnosti preiskovanega analita. Validacija bioanalitske metode vključuje postopke, s katerimi dokažemo, da je izbrana metoda za kvantitativno merjenje določenega analita v biološkem mediju (kri, plazma, serum, urin) zanesljiva in ponovljiva. Našo metodo smo validirali skladno s smernicami FDA o validaciji bioanaliznih metod za industrijo, vpliv matrice in uspešnost ekstrakcije pa skladno s priporočili Matuszewskega s sodelavci (20, 21).

Vrednotili smo naslednje parametre: linearnost, točnost, ponovljivost, uspešnost ekstrakcije, stabilnost, selektivnost in vpliv matrice.

Pri vrednotenju naštetih validacijskih parametrov smo kot odziv ramiprila in ramiprilata upoštevali razmerje odziva analita (površina pod kromatografskim vrhom) in odziva pripadajočega internega standarda (površina pod kromatografskim vrhom) (*enačba 1*).

$$\text{Odziv} = \frac{\text{odziv analita}}{\text{odziv IS}} \quad (\text{enačba 1})$$

*Priprava standardnih raztopin za umeritveno krivuljo in kontrolo kakovosti*

Standardne raztopine smo pripravili z redčenjem delovne raztopine ramiprila in ramiprilata (koncentracija vsakega od analitov v njej je bila 100 µg/mL) s topilom za redčenje in rekonstitucijo (75 % 5 mM amonijevega acetata in 25 % metanola). Pripravili smo 9 standardnih raztopin z različnimi koncentracijami za umeritveno krivuljo. Standardne raztopine za kontrolo kakovosti (QC) smo prav tako pripravili z redčenjem delovnih raztopin ramiprila in ramiprilata z enakim topilom, pri čemer smo uporabili nove zatehte obeh analitov.

Standardne raztopine ramiprila in ramiprilata za umeritveno krivuljo:

Pripravili smo jih v koncentracijah: 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL, 2000 ng/mL in 4000 ng/mL, v topilu za redčenje in rekonstitucijo (5mM amonijev acetat in metanol v razmerju 75 :25 (v/v)).

Standardne raztopine ramiprila in ramiprilata za kontrolo kakovosti:

Pripravili smo 3 standarde in sicer v koncentracijah: 40 ng/mL (QCl), 400 ng/mL (QCm) in 3200 ng/mL (QCh). Za redčenje smo uporabili enako topilo kot v prejšnjem primeru.

*Priprava standardnih plazemskih vzorcev za umeritveno krivuljo in kontrolo kakovosti*

V mikrocentrifugirke smo odpipetirali alikvote po 450 µL slepe plazme, jim dodali po 25 µL ustrezno redčenih standardnih raztopin ramiprila in ramiprilata za umeritveno krivuljo ali standardnih raztopin obeh analitov za kontrolo kakovosti ter po 25 µL delovnih raztopin IS ramiprila in ramiprilata. Vse skupaj smo zmešali in v vsako mikrocentrifugirko dodali še po 500 µL 0,2 M HCl. Tako pripravljene vzorce smo 1 minuto intenzivno mešali nato pa centrifugirali 5 minut na 13200 rpm, pri 4 °C. Za ekstrakcijo smo nato uporabili 900 µL supernatanta vsakega plazemskega vzorca (postopek opisan v poglavju 3.2.2.1. Ekstrakcija). Po ekstrakciji smo vzorce sušili in rekonstituirali (postopek opisan v poglavju 3.2.2.2. Sušenje in rekonstitucija). Iz vsakega smo odpipetirali po 150 µL vzorca in jih analizirali s sistemom LC – MS/MS.

Tako smo pripravili 9 standardov in 2 slepa vzorca (enega z IS in enega brez) za izdelavo umeritvene krivulje ter po 5 paralelk vsakega od vzorcev za kontrolo kakovosti. Slepi vzorec brez IS smo pripravili tako, da smo namesto delovne raztopine ramiprila in ramiprilata ter IS, dodali ekvivalenten volumen bidestilirane vode. Pri slepem vzorcu z IS

pa smo z ekvivalentnim volumnom bidestilirane vode nadomestili le delovno raztopino ramiprila in ramiprilata.

Preglednici IV in V prikazujeta koncentracije ramiprila in ramiprilata v standardnih raztopinah in standardnih plazemskih vzorcih, ki smo jih uporabili za izdelavo umeritvene krivulje in za kontrolo kakovosti.

Preglednica IV: Koncentracije ramiprila in ramiprilata v standardnih raztopinah in standardnih plazemskih vzorcih, ki smo jih uporabili za izdelavo umeritvene krivulje.

Vzorec	Koncentracija standardov ramiprila in ramiprilata (ng/mL)	Koncentracija ramiprila in ramiprilata v plazemskih vzorcih (ng/mL)
slepi	0	0
slepi z IS	0	0
1	10	0,5
2	20	1
3	50	2,5
4	100	5
5	200	10
6	500	25
7	1000	50
8	2000	100
9	4000	200

Preglednica V: Koncentracije ramiprila in ramiprilata v standardnih raztopinah in standardnih plazemskih vzorcih, uporabljenih za kontrolo kakovosti

Kontrolni vzorec (QC)	Koncentracija standardov ramiprila in ramiprilata (ng/mL)	Koncentracija ramiprila in ramiprilata (ng/mL)
QCl	40	2
QCm	400	20
QCh	3200	160

*Priprava dodatnih standardnih raztopin in plazemskih vzorcev za ugotavljanje uspešnosti ekstrakcije*

Slepe plazemske vzorce smo pripravili tako, da smo najprej ekstrahirali 450  $\mu\text{L}$  slepe plazme, ki smo ji pred tem dodali 50  $\mu\text{L}$  bidestilirane vode. Po ekstrakciji in sušenju smo ekstrahiranemu vzorcu dodali ustrezne količine delovnih raztopin ramiprila in ramiprilata (koncentracije analitov so ustrezale QCl, QCm in QCh) ter delovnih raztopin IS obeh analitov, raztopljenih v topilu za redčenje in rekonstitucijo (5 mM amonijev acetat in metanol v razmerju 75 : 25 (v/v)). Celoten volumen posameznega vzorca je tako znašal 200  $\mu\text{L}$  in smo ga uporabili za vrednotenje uspešnosti ekstrakcije.

*Priprava standardnih plazemskih raztopin za relativni učinek matrice*

Za določanje relativnega učinka matrice smo testne vzorce pripravili enako kot smo to opisali v podpoglavju *Priprava standardnih plazemskih vzorcev za umeritveno krivuljo in kontrolo kakovosti*, pri čemer pa smo uporabili drugačne koncentracije v plazmi, in sicer 1, 5, 25, 50, 100 in 200 ng/mL ter slepi vzorec z in brez IS. Uporabili smo plazme, odvzete petim različnim osebam.

### **3.2.5.1 Linearnost**

Linearnost je lastnost metode, da z njo, znotraj določenega intervala (območja), dobimo meritve, ki so neposredno ali pa po njihovi pretvorbi z definiranimi matematičnimi postopki, premosorazmerne s koncentracijami analita v vzorcu. Linearnost ugotavljamo s statistično obdelavo odzivov standardnih vzorcev, pri čemer uporabljamo metodo linearne regresije. Tako določimo umeritveno premico z enačbo  $y = kx + n$ , pri čemer je  $y$  odziv (npr. površina pod kromatografskim vrhom analita ali razmerje površin pod kromatografskima vrhoma analita in IS),  $x$  koncentracija analita v vzorcu,  $k$  naklon premice in  $n$  odsek na ordinati. Umeritvena premica predstavlja statistični model celotne analizne metode in opisuje odnos med koncentracijo analita in izmerjenim odzivom. Korelacijo med koncentracijo v vzorcu in analiznim odzivom vrednotimo s Pearsonovim korelacijskim ( $r$ ) oz. determinacijskim koeficientom ( $r^2$ ). Če je razmak med koncentracijama najvišjega in najnižjega umeritvenega standarda zelo velik, lahko uporabimo uteženo linearno regresijo (npr.  $1/c$  ali  $1/c^2$ ). Naklon in odsek umeritvene premice smo izračunali s pomočjo reševalca v programu Microsoft Office Excel, ki nam je

s spreminjanjem naklona in odseka izbral tiste vrednosti, pri katerih so bile vsota produkta odstopa in uteži za vse koncentracije analita najmanjše. Odstop predstavlja razliko med dejansko vrednostjo odziva analita oz. njegovega razmerja z IS ( $y$ ) in izračunano vrednostjo odziva oz. razmerja z IS, s parametri utežene premice ( $k_2, n_2$ ). Izračunamo ga s pomočjo *enačbe 2* (20).

$$\text{Odstop} = y - (k_2 x + n_2) \quad (\text{enačba 2})$$

Za določanje linearnosti se priporoča uporaba najmanj šestih standardnih vzorcev in slepega vzorca. Najmanj 75 % standardnih vzorcev, med njimi obvezno tudi tisti pri spodnji meji kvantifikacije (LLOQ) in standard z najvišjo koncentracijo analita, morajo pri izračunu koncentracij analitov iz umeritvene premice odstopati za manj kot 15% od njihove nominalne koncentracije oz. manj kot 20%, če gre za vzorec LLOQ. Metoda ustreza smernicam FDA za linearnost v danem območju, v kolikor izmerjeni rezultati ustrezajo postavljenim kriterijem (20).

### 3.2.5.2 Točnost

Točnost analizne metode izraža ujemanje izmerjene vrednosti analitov z referenčno vrednostjo. Točnost določamo z analizo QC z uporabo znanih koncentracij analitov (najmanj tri različne koncentracije vzorcev QC, s katerimi pokrijemo celotno območje metode, in vsaj 5 ponovitev meritev pri vsaki uporabljeni koncentraciji). Za vsak kontrolni vzorec izračunamo njegovo koncentracijo s pomočjo umeritvene premice. Nato izračunamo še povprečno vrednost petih ponovitev meritev za vsako posamezno koncentracijo QC in jih primerjamo z dejanskimi (referenčnimi), kar nam omogoča *enačba 3*. Povprečna izmerjena vrednost analita sme odstopati za manj kot 15% od dejanske vrednosti oz. za manj kot 20% v primeru vzorca LLOQ (20).

$$\text{Točnost [\%]} = \frac{c_{\text{povp. (izračunana)}}}{c_{\text{(referenčna)}}} \times 100 \quad (\text{enačba 3})$$

### 3.2.5.3 Ponovljivost

Ponovljivost je natančnost uporabljenega postopka. Natančnost metode izraža stopnjo ujemanja rezultatov znotraj serij analiz istega homogenega vzorca, v predpisanih pogojih. Običajno jo izražamo kot standardni odklon (SD) ali koeficient variacije (KV) oz. relativni

standardni odklon (RSD). Ponovljivost določamo z analizo vzorcev QC, in sicer z uporabo vsaj treh koncentracij analita in vsaj petih ponovitev meritev pri vsaki koncentraciji. Pri nobeni od koncentracij analita v QC vzorcih vrednost KV petih ponovitev ne sme presegati 15%, v primeru vzorca LLOQ pa 20% dejanskih vrednosti. Vedno določamo znotrajdnevno in meddnevno (vsaj 3 dni) ponovljivost (20).

#### **3.2.5.4 Območje metode**

Območje metode je interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu, znotraj katerega so bile dokazane linearnost, točnost in ponovljivost. Običajno ga določamo v območju linearnosti (20).

#### **3.2.5.5 Meja kvantifikacije**

Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ) je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo z izbrano metodo še lahko kvantitativno ovrednotimo z željeno točnostjo in natančnostjo. Po smernicah FDA je to najnižja točka (standard) na umeritveni premici, ki ustreza naslednjim zahtevam:

- odziv standarda pri vrednosti LLOQ je petkrat višji od odziva slepega vzorca,
- odziv standarda pri vrednosti LLOQ mora ustrezati že prej omenjenim pogojem glede točnosti in ponovljivosti (točnost med 80 in 120%,  $KV \leq 20\%$ ) (20).

#### **3.2.5.6 Selektivnost / specifičnost**

Selektivnost je zmožnost analitske metode, da nedvoumno določi preiskovani analit v vzorcu, ob prisotnosti vseh ostalih sestavin za katere predvidevamo, da so tudi sočasno prisotne v njem (komponente biološkega materiala, metaboliti, razgradni produkti, zdravila, ki jih bolnik sočasno jemlje).

Pri metodah, sklopljenih z masnim spektrometrom, moramo obvezno raziskati učinek matrice ter dokazati, da ne vpliva na točnost, ponovljivost in občutljivost analiznega postopka (20).

Matuszewski in sodelavci so opisali metode, s katerimi lahko ocenimo učinek matrice v kvantitativnih bioanaliznih metodah, ki temeljijo na LC – MS/MS in podali strokovne smernice za njihovo validacijo (21).

- Relativni učinek matrice

Relativni učinek matrice smo določili tako, da smo uporabili pet plazemskih vzorcev odvzetih petim različnim zdravim prostovoljcem in primerjali naklone njihovih

umeritvenih premic. Relativna standardna deviacija naklonov umeritvenih premic pri tem ne sme biti večja od 4 – 5% (21).

### 3.2.5.7 Uspešnost ekstrakcije

Uspešnost ekstrakcije za vsakega od obeh analitov smo določili z razmerjem ekstrahiranega plazemskega vzorca z dodanim analitom in ekstrahiranega slepega plazemskega vzorca, ki smo mu naknadno dodali ustrezne količine delovnih raztopin ramiprila in ramiprilata, ter delovnih raztopin IS, in sicer pri treh različnih koncentracijah, ki so ustrezale vrednostim QCl, QcM in QCh (20). Izvedli smo po 5 ponovitev meritev za vsako od koncentracij, saj nas je poleg učinkovitosti zanimala tudi ponovljivost ekstrakcije. Za izračun uspešnosti ekstrakcije smo uporabili *enačbo 4*.

$$\text{Re (\%)} =$$

$$\frac{\text{Odziv (ekstrahiran plazemski vzorec)}}{\text{Odziv (ekstrahiran slepi plazemski vzorec z naknadno dodanimi raztopinami)}} \times 100$$

(*enačba 4*)

### 3.2.5.8 Stabilnost

- *Stabilnost analitov po zamrzovanju in odtajanju vzorcev*

Za ugotavljanje stabilnosti po zamrzovanju in odtajanju smo plazmi dodali ustrezne koncentracije delovnih raztopin ramiprila in ramiprilata, ki so ustrezale vrednostim QCl, QcM in QCh. Za vsako koncentracijo analitov smo pripravili po tri paralelke. Vzorce smo zamrznili in jih po 24 urah odtajali. Postopek smo ponovili še dvakrat. Vzorce smo analizirali v času  $t = 0$  in po treh ciklih zamrzovanja in odtajanja.

- *Kratkoročna stabilnost analitov*

Za določevanje kratkoročne stabilnosti analitov smo plazmi dodali ustrezne koncentracije delovnih raztopin ramiprila in ramiprilata, ki so ustrezale QCl in QCh. Vzorce smo 6 ur pustili na sobni temperaturi in nato izvedli ekstrakcijo in analizo. Izmerjene odzive smo primerjali s tistimi odzivi, določenimi iz vzorcev, ki smo jih takoj ekstrahirali in analizirali.

- *Postpreparativna stabilnost analitov*

Stabilnost vzorcev smo določili v avtomatskem vzorčevalniku. Za ugotavljanje postpreparativne stabilnosti smo v plazmo dodali ustrezne koncentracije delovnih raztopin ramiprila in ramiprilata, ki so ustrezale koncentracijam QCl, QcM, QCh. Tako pripravljene vzorce smo nato v treh paralelkah analizirali v časih  $t = 0\text{h}$  in  $t = 6\text{h}$ . Vzorce smo hranili pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



### 3.2.6 Analiza realnih plazemskih vzorcev

Validirano analizno metodo smo nato uporabili za analizo realnih bioloških vzorcev. Te smo pridobili od bolnikov s srčnim popuščanjem, ki so že dalj časa redno jemali različne odmerke ramiprila. Vzorci so bili odvzeti tik pred zaužitjem rednega odmerka ramiprila ( $t = 0$ ) ter 1 uro, 2 uri, 3 ure, 4 ure in 5 ur po njegovem zaužitju. Za analizo plazemskih vzorcev na sistemu LC – MS/MS smo uporabili po 475  $\mu\text{L}$  vsakega plazemskega vzorca. Analizirali smo 64 vzorcev 12 različnih bolnikov. Do analize smo jih shranjevali v zamrzovalniku pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*Priprava realnih plazemskih vzorcev bolnikov:* V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 475  $\mu\text{L}$  predhodno dobro premešanega plazemskega vzorca bolnika in mu dodali 25  $\mu\text{L}$  delovne raztopine IS ramiprila in ramiprilata, nato pa še 500  $\mu\text{L}$  0,2 M HCl. Vzorec smo intenzivno mešali 1 minuto nato pa še 5 minut centrifugirali na 13200 rpm, pri temperaturi  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Za ekstrakcijo smo uporabili 900  $\mu\text{L}$  supernatanta tako pripravljenega plazemskega vzorca (opisano v poglavju 3.2.2.1. Ekstrakcija). Ekstrahirane vzorce smo nato sušili in rekonstituirali (opisano v poglavju 3.2.2.2. Sušenje in rekonstitucija).

#### *Vrednotenje rezultatov*

Rezultate smo obdelali s programom Microsoft Office Excel. Najprej smo določili naklone umeritvene premice standardnih plazemskih vzorcev in odseke na ordinati. Te podatke smo potem uporabljali za določevanje koncentracij ramiprila in ramiprilata v realnih vzorcih bolnikov s srčnim popuščanjem.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Za zdravljenje srčnega popuščanja se najpogosteje uporabljajo inhibitorji ACE. Eden izmed njih je tudi ramipril, ki se v jetrih metabolizira v ramiprilat, aktivno obliko zdravilne učinkovine.

Namen diplomske naloge je bil, da razvijemo in validiramo metodo za sočasno spremljanje koncentracij ramiprila in ramiprilata v plazemskih vzorcih bolnikov s srčnim popuščanjem. Zaradi nizkih plazemskih koncentracij preučevanih učinkovin smo kot najprimernejšo izbrali metodo LC – MS/MS, saj je zelo občutljiva in selektivna. Preden smo začeli z njenim razvojem smo najprej razvili postopek za sočasno določanje ramiprila in ramiprilata z metodo HPLC – UV, ki je dostopnejša in cenejša. Uporabili smo jo predvsem za optimizacijo priprave plazemskih vzorcev. Koncentraciji obeh analitov v plazmi so bile v fazi optimizacije metode HPLC – UV veliko višje kot v realnih vzorcih, saj ta postopek ni dovolj občutljiv, da bi z njim lahko ustrezno določali tako majhne količine analitov.

Ko smo uspešno optimizirali pripravo vzorcev smo se lotili optimizacije parametrov metode LC – MS/MS, da bi dosegli čimbolj občutljivo detekcijo obeh analitov. Nato smo novi analizni postopek preizkusili z uporabo plazemskih vzorcev bolnikov, ki so vsebovali realne koncentracije ramiprila in ramiprilata ter metodo validirali v skladu z ustreznimi smernicami za validacijo analiznih metod (20, 21). Primernost metode smo preverili z analizo plazemskih vzorcev bolnikov, ki prejemajo različne odmerke ramiprila.

### 4.1 METODA HPLC – UV

Pri razvoju metode HPLC – UV smo izhajali iz literaturnih podatkov za sočasno analizo ramiprila in ramiprilata ter optimizirali različne parametre (16, 17).

#### *Izbira kolone*

Naša prva izbira je bila kolona Gemini C18 (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), s katero pa nismo dobili ustreznih rezultatov, saj je bil čas analize predolg, poleg tega pa tudi kromatografski vrhovi niso imeli ustreznih oblik.

Zato smo uporabili kolono Gemini C6 – Phenyl (150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m) ter dobili ustrezne oblike in dosegli tudi boljšo resolucijo kromatografskih vrhov, vendar pa je bil čas analize

še vedno precej dolg.

### *Izbira mobilne faze*

Pri uporabi kolone Gemini C18 smo kot mobilno fazo (MF) uporabili amonijev pufer s pH 9 in acetonitril v različnih razmerjih (poglavje 3.2.3. Razvoj metode z uporabo HPLC - UV). Z MF 1 nismo dobili dobrih rezultatov, saj nismo uspeli ločiti kromatografskega vrha za ramiprilat, ki je ostal skrit v vrhu topila. Ustreznejša je bila MF 2, vendar tudi v tem primeru nismo bili zadovoljni z rezultati.

Za delo na koloni Gemini C6- Phenyl pa smo kot mobilno fazo uporabili različna razmerja amonijevega pufra s pH 9 in metanola. Za naše potrebe je bila najustreznejša MF 4 (amonijev pufer s pH 9 : metanol = 50 : 50 (v/v)).

### *Izbira pretoka mobilne faze*

Najprej smo poskusili s pretokom 1,0 mL/min, vendar so bili pri tem tlaki na črpalki previsoki, zato smo ga zmanjšali na 0,8 mL/min.

### *Izbira temperature kolone*

Najustreznejša temperatura kolone je bila 50 °C.

### *Končna analiza z metodo HPLC – UV*

- Kolona: Gemini C6 – Phenyl (150 x 4,6 mm, 3µm)
- Mobilna faza: amonijev pufer pH 9 : metanol = 50 : 50 (v/v)
- Pretok mobilne faze: 0,8 mL/min
- Temperatura kolone: 50 °C
- Valovna dolžina detekcije: 215 nm

Z metodo HPLC – UV smo preverili uspešnost ekstrakcije plazemskih vzorcev. Da smo plazemske vzorce analita lahko očistili nečistot in drugih komponent, ki bi lahko motile analizo, smo razvili metodo priprave plazemskih vzorcev z ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE). Pri tem gre za ionsko – izmenjevalno ločevanje na izrazito kationskem sorbentu. Za metodo SPE smo se odločili na podlagi literaturnih podatkov, saj smo ugotovili, da se najpogosteje uporablja za ekstrakcijo ramiprila in ramiprilata z dobrimi izkoristki (> 80%) (4, 11, 14, 15). Vzorce smo po ekstrakciji sušili in jih rekonstituirali s topilom za

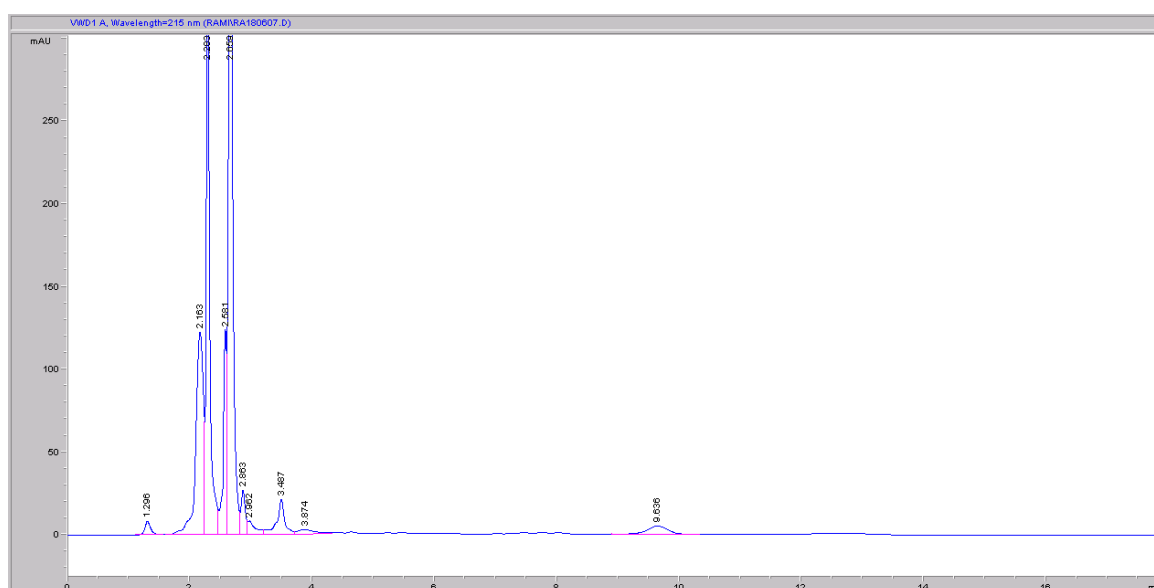
raztapljanje in rekonstitucijo. Ker smo s tem načinom ekstrakcije, katerega pogoje smo določili s pomočjo programa Strata Sample Preparation Method Development Software (Phenomenex) že takoj dosegli dobre izkoristke ekstrakcije in ponovljivost (preglednica VI), nadaljna optimizacija postopka ni bila potrebna.

Preglednica VI: Uspešnost ekstrakcije analitov iz plazemskih vzorcev in ponovljivost metode (n = 3)

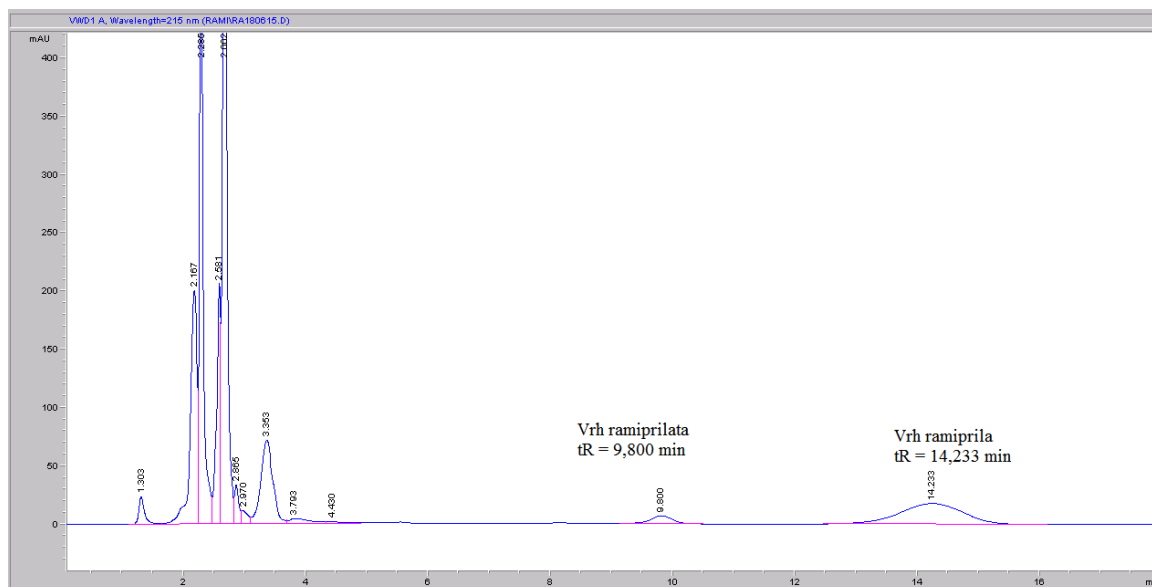
Koncentracije ramiprila in ramiprilata (plazemski vzorci)	RAMIPRIL		RAMIPRILAT	
	Uspešnost ekstrakcije (%)	KV (%)	Uspešnost ekstrakcije (%)	KV (%)
5 µg/mL	79,3	3,64	75,7	13,0
10 µg/mL	78,3	2,95	69,7	3,0

Iz preglednice je razvidno, da je bila uspešnost ekstrakcije za ramipril blizu 80 %, za ramiprilat pa le malo nižja. Prav tako je bila dobra tudi ponovljivost postopka, saj KV ni presegal 13%. Čeprav so koncentracije ramiprila in ramiprilata, ki jih lahko določamo z metodo HPLC – UV višje, pa smo vseeno lahko sklepali, da je naša metoda ekstrakcije primerna, zato smo se lotili razvoja analizne metode LC – MS/MS.

Slika 4 predstavlja kromatogram slepega, slika 5 pa kromatogram plazemskega vzorca z enakima koncentracijama ramiprila in ramiprilata, in sicer 10 µg/mL.



Slika 4: Kromatogram slepega vzorca.

Slika 5: Kromatogram plazemskega vzorca, ki je vseboval 10  $\mu\text{g/mL}$  ramiprila in enako koncentracijo ramiprilata.

## 4.2 METODA LC – MS/MS

Razvili in uporabili smo metodo LC – MS/MS, tipa trojni kvadrupol, ki je visoko selektivna in omogoča spremljanje tako mase starševskih kot tudi hčerinskih ionov. Značilnost tovrstnih instrumentov je tudi ta, da lahko z njimi izvajamo izjemno občutljive kvantitativne analize analitov v kompleksnih bioloških vzorcih.

Za analizo ramiprila in ramiprilata z metodo LC – MS/MS smo za oba preiskovana analita izbrali primerna IS, s pomočjo katerih smo lahko korigirali odziv merjenih učinkovin. Kot IS smo uporabili stabilna devterirana analita, ramipril –  $d_5$ , ramiprilat –  $d_5$  in z njima izboljšali točnost in natančnost metode. V tem primeru imata namreč analit in IS zaradi enakih fizikalno – kemijskih lastnosti enak retencijski čas. Zato sta v masnem spektrometru izpostavljena enakim pogojem ionizacije, poleg tega pa se obnašata enako tudi med postopkom ekstrakcije.

Metodo LC – MS/MS smo razvijali tako, da smo najprej optimizirali detekcijski del (MS/MS), nato pa še kromatografskega (LC). Pri optimizaciji detekcijskega postopka smo nekatere parametre določili z neposrednim dovajanjem vzorca na MS/MS, ostale pa preko kolone. Cilj razvoja naše analizne metode je bilo učinkovito kromatografsko ločevanje merjenih komponent ter specifična in občutljiva detekcija izbranih analitov.

#### 4.2.1 Optimizacija metode MS/MS

Pri optimizaciji metode MS/MS je napomembnejša določitev najustrežnejših prehodov MRM. To smo za standarda ramipril in ramiprilat ter oba IS izvedli s pomočjo programa Optimizer in programske opreme MassHunter. Z avtomatsko optimizacijo smo dobili tudi podatke o optimalni vrednosti nastavitvev fragmentorja in kolizijske energije. Vrednost za fragmentor predstavlja razliko v napetostih na začetku masnega spektrometra, kjer ioni nastanejo in kolizijsko energijo. Cilj je, da v kolizijsko celico pride čimveč osnovnega iona, zato imajo prehodi MRM enake vrednosti za nastavitve fragmentorja.

Optimizirali smo tudi pogoje, ki pomembno prispevajo k ionizaciji v masnem analizatorju. Z ročno nastavitvijo smo najprej poiskali optimalni temperaturi sušilnega plina in pretoka plina Jetstream<sup>®</sup> ter najustrežnejši napetosti na kapilari in na šobi. Med optimizacijo parametrov smo vrednotili odzivnost pri izbranih prehodih MRM ramiprila in ramiprilata. Parametre masnega analizatorja v povezavi z LC pa smo določili s predhodno kromatografsko separacijo na izbrani koloni. Z ročno optimizacijo smo določili najprimernejše vrednosti za pretoke nebulizacijskega, sušilnega in Jetstream<sup>®</sup> plina ter razdelilni čas.

##### *Končna metoda MS/MS*

Kot vir smo uporabili elektrosprejsko ionizacijo (ESI) s pozitivnim načinom ionizacije. V preglednici VII so podane vrednosti nastavitve parametrov multirezidualne metode (MRM) za vsak posamezen analit, ostale nastavitve masnega analizatorja pa so predstavljene v preglednici VIII.

Preglednica VII: Nastavitve MRM za posamezen analit

Analit	Prehod MRM	Fragmentor (V)	Kolizijska energija (eV)
RAMIPRIL-d <sub>5</sub>	422,3 → 239,3	121	15
RAMIPRIL	417,2 → 234,2	121	15
RAMIPRILAT-d <sub>5</sub>	394,3 → 211,2	121	15
RAMIPRILAT	389,3 → 206,2	121	15

Preglednica VIII: Nastavitve masnega analizatorja

<b>Sušilni plin</b>	275 °C, pretok 5 L/min
<b>Nebulizacijski plin</b>	45 psi
<b>Plin Jetstream<sup>®</sup></b>	320 °C, pretok 11 L/min
<b>Napetost na kapilari</b>	4000 V
<b>Nozzle voltage<sup>®</sup> (napetost na šobi)</b>	1000 V
<b>Razdelilni čas (ang. Dwell time)</b>	50 ms

#### 4.2.2 Optimizacija metode LC

S kolono Kinetex C18 (50 x 2,10 mm, 2,6 µm) in predkolono Kinetex C18 (4 x 2 mm) smo uspeli kromatografsko ločiti ramipril in ramiprilat, zato smo to kombinacijo uporabili tudi za optimizacijo ostalih kromatografskih pogojev in kasnejšo analizo vzorcev.

Vodni del MF ponavadi vsebuje dodatke, s katerimi povečamo ionizacijo preučevanih analitov, to pa se odraža v povečanju njihovih odzivnosti. Za pozitivni način ionizacije je 0,1 % mravljična kislina klasičen vodni del MF, zato smo jo uporabili tudi mi. Za kolone kot je Kinetex C18 pa se kot organski modifikator največkrat uporablja acetonitril, ki smo ga izbrali tudi mi. Po izboru MF smo optimizirali še gradientni program izpiranja. Spreminjali smo pretok MF in testirali različne programe gradientnega izpiranja. Kot najprimernejšega smo izbrali tistega z začetno koncentracijo acetonitrila 30%, pri pretoku MF 0,5 mL/min. Prikazan je v preglednici IX.

#### *Končna metoda LC*

Kolono smo termostatirali na temperaturo 50 °C. Z avtomatskim vzorčevalnikom smo nanjo injicirali po 1 µL vsakega vzorca in po vsakem injiciranju po 10 sekund spirali aplikacijsko iglo. Mobilno fazo smo na kolono črpali iz dveh rezervoarjev, preko sistema binarnih črpalk. Mobilna faza A je bila 0,1 % mravljična kislina, mobilna faza B pa 98 % acetonitril. Za analizo pa smo uporabili gradientno metodo izpiranja, ki je prikazana v preglednici IX.

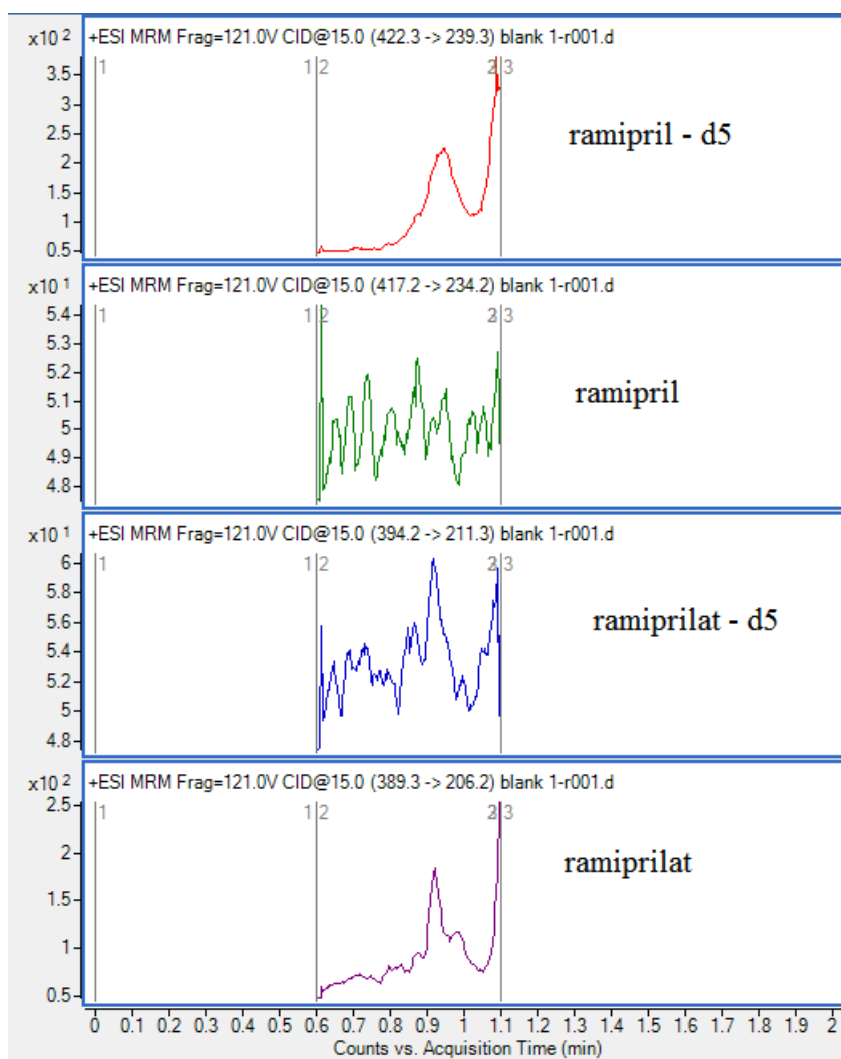


Preglednica IX: Program gradientnega izpiranja kolone.

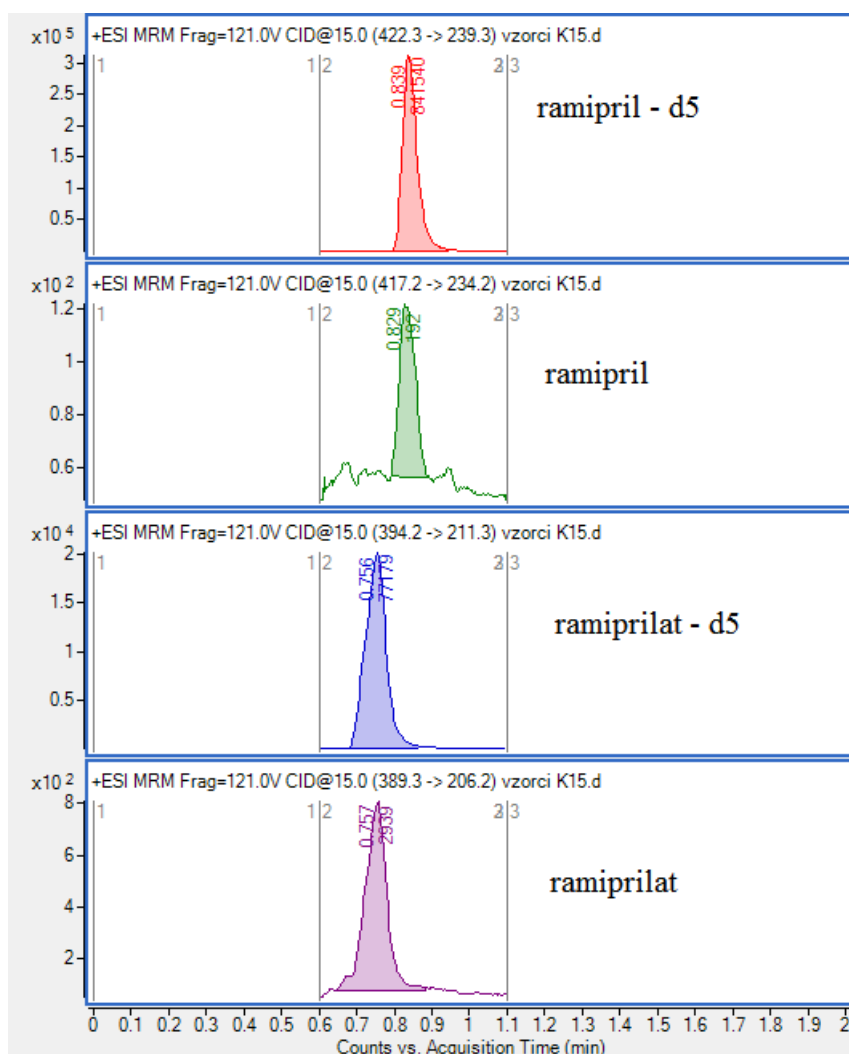
Čas (min)	Delež 98 % acetonitrila (%)
0	30
0,1	30
0,7	85
1	85
1,1	10

Celoten potek analize je trajal 2 minuti, čas reekvilibracije je bil 0,03 minute, pretok mobilne faze pa 0,5 mL/min.

Slika 6 ponazarja odzive na masnem spektrometru v primeru slepega plazemskega vzorca, slika 7 pa odzive obeh analitov in njunih IS v primeru realnega plazemskega vzorca.



Slika 6: Odziv na masnem spektrometru v primeru slepega plazemskega vzorca.



Slika 7: Odziv obeh analitov in njunih IS na masnem spektrometru v primeru realnega plazemskega vzorca (bolnik k15)

### 4.3 VALIDACIJA

Z validacijo smo želeli potrditi ustreznost in zanesljivost naše metode za ugotavljanje plazemskih koncentracij ramiprila in ramiprilata.

Izvajali smo jo tri zaporedne dni, in sicer po postopkih, ki so opisani v poglavju 3.2.5. Validacija metode.

### 4.3.1 Linearnost

Linearnost metode smo določali tako, kot je opisano v poglavju 3.2.5. Validacija metode. V preglednici X so podani odzivi (razmerja med površinami kromatografskih vrhov analitov in njunih IS) standardnih plazemskih vzorcev, na osnovi katerih smo določili umeritveno krivuljo za ramipril in ramiprilat.

Preglednica X: Odzivi (površine pod kromatografskimi vrhovi) standardnih plazemskih vzorcev za določitev umeritvene krivulje za ramipril in ramiprilat.

Koncentracija c(ng/mL)	RAMIPRIL			RAMIPRILAT		
	Odziv	Odziv IS	Odziv/IS	Odziv	Odziv IS	Odziv/IS
<b>0 (brez IS)</b>	451	/	/	19	/	/
<b>0 (z IS)</b>	1622	2129558	0,000762	589	276327	0,002133
<b>0,5</b>	3685	1997579	0,001845	970	248218	0,003906
<b>1</b>	6332	2185958	0,002897	2035	289162	0,007039
<b>2,5</b>	14015	2076736	0,006749	3730	270605	0,013784
<b>5</b>	23273	2016759	0,01154	6376	262942	0,024247
<b>10</b>	44801	1965429	0,022795	11617	243710	0,047666
<b>25</b>	112687	2019534	0,055798	31172	260509	0,119656
<b>50</b>	226981	1936252	0,117227	61070	248471	0,245785
<b>100</b>	468509	2059690	0,227466	138525	286231	0,483964
<b>200</b>	902172	1949689	0,462726	253303	256512	0,98749

Iz odzivov analitov v standardnih plazemskih vzorcih smo določili enačbe ustreznih umeritvenih krivulj in determinacijske koeficiente ( $r^2$ ). Umeritveno premico smo utežili z utežema 1 in 2. Metoda uteževanja je namreč pri metodi LC – MS/MS sprejemljiva. Za utež 1 smo uporabili  $1/c$ , za utež 2 pa  $1/c^2$  ter s tem skušali izboljšati točnost koncentracij. Ugotovili smo, da je bila za to primernejša utež  $1/c^2$ , kar smo določili z ugotavljanjem najmanjših vsot odstopov umeritvenih premic. Rezultate smo zbrali v preglednici XI. Preglednica XII pa prikazuje naklone, odseke in linearnost umeritvenih premic, in sicer bodisi brez utežitve ali pa z utežitvijo  $1/c^2$ .

Preglednica XI: Vsote odstopov neutežeih in različno uteženih umeritvenih premic za ramipril in ramiprilat.

	Vsota odstopov	
	RAMIPRIL	RAMIPRILAT
<b>Neutežena</b>	2,27E-05	1,07E-04
<b>Utežena 1/c</b>	5,73E-07	3,06E-06
<b>Utežena 1/c<sup>2</sup></b>	5,17E-08	5,80E-07

Vidimo, da smo najmanjši vsoti odstopov umeritvenih premic za ramipril in ramiprilat dobili z uporabo uteži  $1/c^2$ .

Preglednica XII: Nakloni, odseki in linearnost umeritvenih premic ramiprila in ramiprilata brez utežitve in z utežitvijo  $1/c^2$ .

	RAMIPRIL		RAMIPRILAT	
	Neutežena	Utežena z $1/c^2$	Neutežena	Utežena z $1/c^2$
<b>k</b>	0,00230	0,00226	0,00490	0,00481
<b>n</b>	0,00003	0,00070	-0,00060	0,00163
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9999	/	0,9999	/

Preglednica XIII prikazuje izračun koncentracij in njihovih točnosti v primerih neuteženih in uteženih ( $1/c^2$ ) umeritvenih premic za ramipril, preglednica XIV pa enako za ramiprilat.

Preglednica XIII: Izračuni koncentracij ramiprila in njihove točnosti, izvedeni s pomočjo neuteženih in uteženih ( $1/c^2$ ) umeritvenih premic.

c (ng/mL)	Izračunana koncentracija (ng/mL) neutežena	Točnost (%) neutežena	Utež 2	Izračunana koncentracija (ng/mL)	Točnost utežena (%)
0 (brez IS)	/	/	/	/	/
0 (z IS)	0,318160	/	/	0,025788	/
0,5	0,789027	<b>157,8</b>	4	0,503991	<b>100,8</b>
1	1,246308	<b>124,6</b>	1	0,968396	<b>96,8</b>
2,5	2,921206	<b>116,8</b>	0,16	2,669389	<b>106,8</b>
5	5,004191	<b>100,1</b>	0,04	4,784825	<b>95,7</b>
10	9,897720	<b>99,0</b>	0,01	9,754593	<b>97,5</b>
25	24,247157	<b>97,0</b>	0,0016	24,32759	<b>97,3</b>
50	50,955151	<b>101,9</b>	0,0004	51,45168	<b>102,9</b>
100	98,885151	<b>98,9</b>	0,0001	100,1284	<b>100,1</b>
200	201,172278	<b>100,6</b>	0,000025	204,0091	<b>102,0</b>

Preglednica XIV: Izračuni koncentracij ramiprilata in njihove točnosti, izvedeni s pomočjo z neuteženih in uteženih ( $1/c^2$ ) umeritvenih premic.

c (ng/mL)	Izračunana koncentracija (ng/mL) neutežena	Točnost (%) neutežena	Utež 2	Izračunana koncentracija (ng/mL)	Točnost utežena (%)
0 (brez IS)	/	/	/	/	/
0 (z IS)	0,557660	/	/	0,103508	/
0,5	0,919580	<b>183,9</b>	4	0,472216	<b>94,4</b>
1	1,558892	<b>155,9</b>	1	1,123518	<b>112,4</b>
2,5	2,935515	<b>117,4</b>	0,16	2,525961	<b>101,0</b>
5	5,070798	<b>101,4</b>	0,04	4,701294	<b>94,0</b>
10	9,850211	<b>98,5</b>	0,01	9,570347	<b>95,7</b>
25	24,542093	<b>98,2</b>	0,0016	24,53779	<b>98,2</b>
50	50,282666	<b>100,6</b>	0,0004	50,76114	<b>101,5</b>
100	98,890513	<b>98,9</b>	0,0001	100,2807	<b>100,3</b>
200	201,650975	<b>100,8</b>	0,000025	204,9685	<b>102,5</b>

Ugotovili smo, da je naša metoda linearna za oba analita, in sicer v koncentracijskem območju od 0,5 ng/mL do 200 ng/mL. Determinacijski koeficient ( $r^2$ ) za ramipril in ramiprilat je bil namreč 0,999. Območje linearnosti naše metode se ujema z literaturnimi podatki, kajti navajajo lineranost za ramipril in ramiprilat med 0,1 oz. 0,5 ng/ml do 80 oz. 250 ng/ml (4, 11 – 13).

#### 4.3.2 Točnost

Točnost metode smo določali skladno s postopkom, ki je opisan v poglavju 3.2.5. Validacija metode, in sicer z analizo vzorcev QC. Iz povprečja petih meritev vsakega vzorca QC smo izračunali koncentracijo analita, ki ga je posamezen vzorec vseboval, s pomočjo utežene umeritvene premice. Preglednici XIV in XV prikazujeta koncentracije (ng/mL) ramiprila in ramiprilata v vzorcih QC in točnost naše metode za analizo njihovih plazemskih vzorcev.

Preglednica XIV: Izmerjene koncentracije ramiprila (ng/mL) v vzorcih QC in točnost uporabljene metode.

	Koncentracije ramiprila (ng/mL)								
	QCl (2 ng/mL)			QCm (20 ng/mL)			QCh (160 ng/mL)		
Ponovitev	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
1.	2,10	1,97	2,13	18,73	18,53	21,39	152,94	158,46	178,90
2.	1,83	1,94	2,17	18,20	18,63	21,41	188,83	156,34	179,41
3.	1,84	1,95	2,17	18,51	18,72	21,49	156,86	154,68	177,17
4.	1,95	1,96	2,19	18,79	18,50	21,33	154,81	154,54	181,02
5.	1,91	1,94	2,29	18,40	18,40	21,56	153,03	154,93	179,59
<b>Povprečje (ng/mL)</b>	<b>1,92</b>	<b>1,95</b>	<b>2,19</b>	<b>18,53</b>	<b>18,55</b>	<b>21,44</b>	<b>161,29</b>	<b>155,79</b>	<b>179,22</b>
<b>Točnost (%)</b>	<b>96,2</b>	<b>97,6</b>	<b>109,6</b>	<b>92,6</b>	<b>92,8</b>	<b>107,2</b>	<b>100,8</b>	<b>97,7</b>	<b>112,0</b>

Preglednica XV: Izmerjene koncentracije ramiprilata (ng/mL) v vzorcih QC in točnost uporabljene metode.

	Koncentracije ramiprilata (ng/mL)								
	QCl (2 ng/mL)			QCm (20 ng/mL)			QCh (160 ng/mL)		
Ponovitev	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
1.	2,28	1,79	1,98	21,70	21,79	22,07	178,95	184,12	184,55
2.	2,20	1,98	2,04	21,18	21,93	21,85	179,20	186,48	187,31
3.	2,08	1,99	2,26	21,50	21,37	22,05	185,41	182,23	184,73
4.	2,11	2,20	2,48	21,54	21,38	22,07	180,93	180,25	186,54
5.	2,18	2,15	2,40	21,56	21,14	22,30	180,37	180,70	176,56
<b>Povprečje (ng/mL)</b>	<b>2,17</b>	<b>2,02</b>	<b>2,23</b>	<b>21,50</b>	<b>21,52</b>	<b>22,07</b>	<b>180,97</b>	<b>182,75</b>	<b>183,94</b>
<b>Točnost (%)</b>	<b>108,4</b>	<b>101,1</b>	<b>111,6</b>	<b>107,5</b>	<b>107,6</b>	<b>110,3</b>	<b>113,1</b>	<b>114,2</b>	<b>115,0</b>

Ugotovili smo, da je točnost metode za ramipril in ramiprilat ustrezna. Vse tri zaporedne dni validacije, je bilo pri vseh uporabljenih koncentracijah vzorcev QC odstopanje od dejanske (referenčne) vrednosti manjše od 15%. Tako smo z validacijo potrdili, da je naša



metoda točna in primerna za kvantitativno določanje ramiprila in ramiprilata v plazemskih vzorcih.

### 4.3.3 Ponovljivost

Ponovljivost metode smo ugotavljali po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.5. Validacija metode.

#### *Znotrajdnevna ponovljivost*

Znotrajdnevna ponovljivost je podana v obliki koeficienta variacije (KV) odzivov pri enakih koncentracijah vzorcev QC ramiprila in ramiprilata, ki smo jih analizirali znotraj enega dneva. V preglednici XVI so zbrani rezultati znotrajdnevne ponovljivosti za ramipril, v preglednici XVII pa za ramiprilat. Meritve vsakega od preiskovanih vzorcev smo izvedli petkrat.

Preglednica XVI: Znotrajdnevna ponovljivost meritev ramiprila

Koeficient variacije odzivov (KV) (%)								
QC1 (2 ng/mL)			QCm (20 ng/ml)			QCh (160 ng/mL)		
1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
5,62	0,75	2,81	1,30	0,66	0,41	9,59	1,06	0,78

Preglednica XVII: Znotrajdnevna ponovljivost meritev ramiprilata

Koeficient variacije odzivov (KV) (%)								
QC1 (2 ng/mL)			QCm (20 ng/ml)			QCh (160 ng/mL)		
1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
3,73	7,98	9,79	0,90	1,51	0,73	1,44	1,41	2,33

*Meddnevna ponovljivost*

Meddnevno ponovljivost predstavlja vrednost KV izmerjenih odzivov enakih koncentracij analita v posameznem vzorcu QC, ki smo jih analizirali v treh zaporednih dneh. V preglednici XVIII so predstavljeni rezultati meddnevne ponovljivosti za ramipril, v preglednici XIX pa za ramiprilat. Vsakega od uporabljenih vzorcev QC smo izmerili petkrat.

Preglednica XVIII: Meddnevna ponovljivost meritev koncentracij ramiprila

	QCl (2 ng/mL)		QCm (20 ng/mL)		QCh (160 ng/mL)	
	Povp. odziv/IS	Povp.izrač. konc. (ng/mL)	Povp. odziv/IS	Povp.izrač. konc. (ng/mL)	Povp. odziv/IS	Povp.izrač. konc. (ng/mL)
<b>1.dan</b>	0,0051	1,924	0,0427	18,527	0,3660	161,295
<b>2.dan</b>	0,0051	1,952	0,0427	18,555	0,3535	155,791
<b>3.dan</b>	0,0058	2,191	0,0493	21,437	0,4066	179,217
<b>KV (%)</b>	<b>6,29</b>	<b>7,26</b>	<b>8,44</b>	<b>8,57</b>	<b>7,39</b>	<b>7,40</b>

Preglednica XIX: Meddnevna ponovljivost za ramiprilat

	QCl (2 ng/mL)		QCm (20 ng/mL)		QCh (160 ng/mL)	
	Povp. odziv/IS	Povp.izrač. konc. (ng/mL)	Povp. odziv/IS	Povp.izrač. konc. (ng/mL)	Povp. odziv/IS	Povp.izrač. konc. (ng/mL)
<b>1.dan</b>	0,0121	2,169	0,1050	21,496	0,8721	180,972
<b>2.dan</b>	0,0114	2,022	0,1052	21,523	0,8806	182,754
<b>3.dan</b>	0,0124	2,233	0,1078	22,067	0,8863	183,938
<b>KV (%)</b>	<b>4,36</b>	<b>5,05</b>	<b>1,46</b>	<b>1,48</b>	<b>0,82</b>	<b>0,82</b>

Tako znotraj kot tudi meddnevna ponovljivost meritev koncentracij ramiprila in ramiprilata ustrežata smernicam, ki jih predpisuje FDA, saj sta manjši od 10 % pri vseh izmerjenih koncentracijah vzorcev QC.

**4.3.4 Območje metode**

Območje smo določili znotraj meja linearnosti. Območje metode za ramipril in ramiprilat je bilo med 0,5 ng/mL in 200 ng/mL.

#### 4.3.5 Meja kvantifikacije

Meja določitve koncentracij ramiprila in ramiprilata je najnižja točka, ki jo lahko še zaznamo na umeritveni premici, v našem primeru je to 0,5 ng/mL.

Med različnimi objavljenimi metodami smo zasledili, da je bila spodnja meja kvantifikacije za oba omenjena analita med 0,1 in 0,5 ng/ml (4, 11 – 13). Očitno je torej naša meja kvantifikacije 0,5 ng/mL, ki smo jo dosegli z našo metodo, primerna.

#### 4.3.6 Selektivnost / specifičnost

Pri ugotavljanju selektivnosti/specifičnosti smo določali relativni učinek matrice in sicer skladno s postopkom, ki je opisan v poglavju 3.2.5. Validacija metode.

Pri analizah z metodo LC – MS/MS je bistvenega pomena, da dokažemo odsotnost vplivov matrice na odzive analita, saj je detekcija zelo občutljiva in selektivna. Prisotnost matrice namreč lahko vpliva na zmanjšanje ali povečanje odziva našega analita. Vpliv matrice je lahko prisoten tudi v primeru, da v slepem vzorcu ne zaznamo kromatografskih vrhov (22). Primerjali smo naklone umeritvenih premic analitov izoliranih iz petih različnih vzorcev plazme. Rezultati, ki prikazujejo relativne učinke matrice, so prikazani v preglednici XX. Pri tem smo upoštevali naklone uteženih (utež  $1/c^2$ ) umeritvenih premic za oba analita.

Preglednica XX: Naklone uteženih umeritvenih premic za ramipril in ramiprilat določenih v različnih vzorcih plazem.

	PLAZMA IN NAKLONI					RELATIVNI UČINEK MATRICE	
	Pl. 1	Pl. 2	Pl. 3	Pl. 4	Pl. 5	Povp. naklonov	KV (%)
<b>ramipril</b>	0,109215	0,121758	0,119850	0,122101	0,121845	0,118954	<b>4,64</b>
<b>ramiprilat</b>	0,115296	0,103496	0,114337	0,116275	0,117006	0,113282	<b>4,91</b>

Koeficient variacije (KV) naklonov je bil 4,64% za ramipril in 4,91% za ramiprilat, kar ustreza smernicam objavljenim v članku Matuszewskega, ki dopuščajo KV med 4 in 5% (21). S tem smo dokazali odsotnost relativnega učinka matrice za oba analita.

#### 4.3.7 Uspešnost ekstrakcije

Najpogosteje se za ramipril in ramiprilat uporabili ekstrakcijo na trdnem nosilcu, ki omogoča dobre izkoristke (> 80%) (4, 11, 14, 15). Zato smo se tudi mi odločili, da bomo oba omenjena analita ekstahirali z ekstrakcijo SPE. Pri tem smo za elucijo uporabili 5% raztopino amonijaka v metanolu. Vrednotili smo uspešnost ekstrakcije tako za ramipril kot za ramiprilat ter oba IS.

Uspešnost ekstrakcije smo ugotavljali po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.5. Validacija metode.

Preglednica XXII prikazuje podatke o uspešnosti ekstrakcije in njeni ponovljivosti za ramipril, preglednica XXIII pa enako za IS ramiprila. V preglednicah XXIV in XXV pa so zbrani tovrstni rezultati tudi za ramiprilat in njegov IS.

Preglednica XXII: Uspešnost ekstrakcije ramiprila in njena ponovljivost.

Vzorec	Ekstrahiran vzorec		Ekstrahiran slepi vzorec z naknadno dodanimi raztopinami		Izkoristek(%)	Povp. izkoristek (%)	KV (%)
	Povp. odziv	KV (%)	Povp. odziv	KV (%)			
<b>QCl (2ng/mL)</b>	4058,4	0,41	4134,0	2,81	<b>98,2</b>	<b>99,7</b>	1,41
<b>QCm (20ng/mL)</b>	37475,7	2,01	37099,2	3,42	<b>101,0</b>		
<b>QCh (160ng/mL)</b>	329134,1	3,93	329816,2	0,96	<b>99,8</b>		

Preglednica XXIII: Uspešnost ekstrakcije IS ramiprila in njena ponovljivost.

Vzorec	Ekstrahirani vzorec		Ekstrahirani slepi vzorec z naknadno dodanimi raztopinami		Izkoristek (%)	Povp. izkoristek (%)	KV (%)
	Povp. odziv IS	KV (%)	Povp. odziv IS	KV (%)			
QCl (2ng/mL)	887801,0	3,96	843625,5	1,14	105,2	101,3	3,30
QCm (20ng/mL)	861292,0	1,26	866442,1	3,85	99,4		
QCh (160ng/mL)	884021,9	3,35	889293,4	1,12	99,4		

Preglednica XXIV: Uspešnost ekstrakcije ramiprilata in njena ponovljivost.

Vzorec	Ekstrahirani vzorec		Ekstrahirani slepi vzorec z naknadno dodanimi raztopinami		Izkoristek (%)	Povp. izkoristek (%)	KV (%)
	Povp. odziv	KV (%)	Povp. odziv	KV (%)			
QCl (2ng/mL)	1382,0	4,43	1515,8	8,00	91,2	98,3	6,35
QCm (20ng/mL)	13079,8	2,38	12711,3	1,58	102,9		
QCh (160ng/mL)	107238,0	3,40	106431,2	1,47	100,8		

Preglednica XXV: Uspešnost ekstrakcije IS ramiprilata in njena ponovljivost.

Vzorec	Ekstrahirani vzorec		Ekstrahirani slepi vzorec z naknadno dodanimi raztopinami		Izkoristek (%)	Povp. izkoristek (%)	KV (%)
	Povp. odziv IS	KV (%)	Povp. odziv IS	KV (%)			
<b>QCl (2ng/ mL)</b>	83019,9	2,95	79818,9	1,24	<b>104,0</b>	<b>101,8</b>	1,95
<b>QCm (20ng/mL)</b>	82319,5	2,32	81437,6	3,02	<b>101,1</b>		
<b>QCh (160ng/mL)</b>	82187,3	2,25	82022,5	1,19	<b>100,2</b>		

V primerjavi z literaturnimi podatki smo dosegli precej visoke izkoristke ekstrakcije, saj je bil povprečen izkoristek za ramipril 99,7%, za ramiprilat pa 98,3%. Prav tako sta bila visoka tudi povprečna izkoristka ekstrakcije IS ramiprila (101,3%) in ramiprilata (101,8%). Dosegli pa smo tudi dobre ponovljivosti izkoristkov ekstrakcije, saj vrednosti KV niso presežali 7 %.

### 4.3.8 Stabilnost

#### *Stabilnost po zamrzovanju in odtajanju plazemskih vzorcev*

Plazemske vzorce za ugotavljanje stabilnosti po njihovem zamrzovanju in odtajanju smo pripravili tako, kot je to opisano v poglavju 3.2.5. Validacija metode.

Preglednica XXVI prikazuje rezultate določevanja stabilnosti ramiprila po treh ciklih zamrzovanja in odtajevanja plazemskih vzorcev, in sicer v obliki relativnih sprememb odziva/IS. V preglednici XXVII pa so zbrani istovrstni rezultati za ramiprilat.

Preglednica XXVI: Stabilnost po zamrzovanju in odtajevanju plazemskih vzorcev z ramiprilom

Koncentracija	POVPREČEN ODZIV/IS pred cikli zamrzovanja in odtajevanja	POVPREČEN ODZIV/IS po ciklih zamrzovanja in odtajevanja	SPREMEMBA ODZIVA/IS (%)
<b>QCl (2 ng/mL)</b>	0,005666	0,005804	<b>2,4</b>
<b>QCh (160 ng/mL)</b>	0,406578	0,412805	<b>1,5</b>

Preglednica XXVII: Stabilnost po zamrzovanju in odtajevanju plazemskih vzorcev z ramiprilatom

Koncentracija	POVPREČEN ODZIV/IS pred cikli zamrzovanja in odtajevanja	POVPREČEN ODZIV/IS po ciklih zamrzovanja in odtajevanja	SPREMEMBA ODZIVA/IS (%)
<b>QCl (2 ng/mL)</b>	0,012373	0,013557	<b>9,6</b>
<b>QCh (160 ng/mL)</b>	0,886339	0,898286	<b>1,3</b>

Stabilnost po zamrzovanju in odtajevanju je bila ustrezna v primeru uporabe plazemskih vzorcev QCl in QCh, saj je bila znotraj dovoljenih 15%. S stabilnostjo plazemskih vzorcev po večkratnem zamrzovanju in odtajevanju smo dokazali, da lahko isti plazemski vzorec večkrat odmrznemo in ponovno zamrznemo.

*Kratkoročna stabilnost analitov*

Vzorce za določanje kratkoročne stabilnosti smo pripravili skladno s postopkom, ki je opisan v poglavju 3.2.5. Validacija metode.

V preglednici XXVIII so zbrani rezultati ugotavljanja kratkoročne stabilnosti za ramipril, in sicer v obliki relativnih sprememb odzivov/IS ramiprila v odvisnosti od časa. V preglednici XXIX pa so prikazani istovrstni rezultati za ramiprilat.

Preglednica XXVIII: Kratkoročna stabilnost ramiprila v kontrolnih plazemskih vzorcih

Koncentracija	POVPREČEN ODZIV/IS (t = 0 h)	POVPREČEN ODZIV/IS (t = 6 h)	SPREMEMBA ODZIVA/IS (%)
<b>QCl (2 ng/mL)</b>	0,005666	0,005734	<b>1,2</b>
<b>QCm (20 ng/mL)</b>	0,049253	0,049844	<b>1,2</b>
<b>QCh (160 ng/mL)</b>	0,406578	0,391093	<b>3,9</b>

Preglednica XXIX: Kratkoročna stabilnost ramiprilata v kontrolnih plazemskih vzorcih

Koncentracija	POVPREČEN ODZIV/IS (t = 0 h)	POVPREČEN ODZIV/IS (t = 6 h)	SPREMEMBA ODZIVA/IS (%)
<b>QCl (2 ng/mL)</b>	0,012373	0,012767	<b>3,2</b>
<b>QCm (20 ng/mL)</b>	0,107772	0,109166	<b>1,3</b>
<b>QCh (160 ng/mL)</b>	0,886339	0,867261	<b>2,2</b>

Pri ugotavljanju kratkoročne stabilnosti smo ugotovili minimalne spremembe v odzivih kontrolnih plazemskih vzorcev z ramiprilom in ramiprilatom (1,2 – 3,9 %). To je dokaz, da so plazemski vzorci na sobni temperaturi stabilni najmanj šest ur pri teh pogojih ne pride do večjih izgub obeh analitov. Iz rezultatov lahko torej sklepamo, da ni nujno da plazemski vzorec analiziramo nemudoma po odmrznitvi, ampak ga lahko še vsaj šest ur pred testiranjem hranimo na sobni temperaturi.



*Postpreparativna stabilnost analitov*

Tudi postpreparativno stabilnost smo določali po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.5. Validacija metode.

Preglednica XXX prikazuje rezultate ugotavljanja postpreparativne stabilnosti ramiprila in sicer v obliki relativnih sprememb odziv/IS, v odvisnosti od časa. V Preglednici XXXI pa so predstavljeni istovrstni rezultati za ramiprilat.

Preglednica XXX: Postpreparativna stabilnost ramiprila

Koncentracija	POVPREČEN ODZIV/IS t = 0h	POVPREČEN ODZIV/IS t = 6h	sprememba odziva (%)
<b>QCl</b> <b>(2 ng/mL)</b>	0,00559	0,00567	<b>1,4</b>
<b>QCm</b> <b>(20 ng/mL)</b>	0,04912	0,04925	<b>0,3</b>
<b>QCh</b> <b>(160 ng/mL)</b>	0,40389	0,40795	<b>1,0</b>

Preglednica XXXI: Postpreparativna stabilnost za ramiprilat

Koncentracija	POVPREČEN ODZIV/IS t = 0h	POVPREČEN ODZIV/IS t = 6h	sprememba odziva (%)
<b>QCl</b> <b>(2 ng/mL)</b>	0,01252	0,01237	<b>1,2</b>
<b>QCm</b> <b>(20 ng/mL)</b>	0,11191	0,10777	<b>3,8</b>
<b>QCh</b> <b>(160 ng/mL)</b>	0,93023	0,88634	<b>5,0</b>

Pri ugotavljanju postpreparativne stabilnosti smo plazemske vzorce z ramiprilom in ramiprilatom šest ur pustili stati v vzorčevalniku, in sicer pri 4 °C. Največja sprememba vrednosti odziv/IS je znašala 1,4% za ramipril in 5,0% za ramiprilat, kar oboje ustreza standardom iz smernic FDA.

Z našim postopkom validacije smo potrdili zanesljivost in ustreznost naše metode za spremljanje koncentracij ramiprila in ramiprilata v plazmi.

#### 4.4 ANALIZA REALNIH PLAZEMSKIH VZORCEV

Zdravilno učinkovino ramipril lahko bolniki jemljejo v različnih odmerkih, in sicer 1,25 mg, 2,5 mg, 5 mg in 10 mg. Priporočeni začetni odmerek za bolnike s srčnim popuščanjem, ki so stabilizirani s sočasnim diuretičnim zdravljenjem, je 1,25 mg na dan. Odmerke zdravila je potrebno titrirati z njihovim podvojevanjem na en do dva tedna, in sicer vse do največjega dnevnega odmerka, ki je 10 mg. Bolniki naj bi zdravilo jemali dvakrat na dan (5).

V okviru diplomske naloge smo analizirali plazemske vzorce odvzete bolnikom, ki so redno jemali ramipril v različnih odmerkih. V preglednici XXXII so prikazani odmerki ramiprila, ki so jih bolniki prejeli tik pred odvzemom krvnih vzorcev.

Po uporabi običajnih odmerkov, enkrat na dan, dosežejo plazemske koncentracije ramiprilata stacionarno stanje v plazmi po približno četrtem dnevu zdravljenja (5).

Preglednica XXXII: Odmerki ramiprila, ki so jih prejeli posamezni bolniki pred odvzemom krvnih vzorcev

Bolnik	k2	k3	k6	k8	k9	k11	k14	k15	k16	k17	k18	k20
Konc. zdravilne uč. (mg)	5	5	2,5	5	2,5	1,25	5	2,5	5	2,5	5	2,5

Vzorce plazme bolnikov smo odvzeli v času 0 (to je tik preden so prejeli naslednji redni odmerek ramiprila) ter bodisi 1, 2, 3, 4 ali 5 ur po prejetju tega odmerka.

Realne plazemske vzorce smo pripravili tako, kot je opisano v poglavju 3.2.6. Analiza realnih plazemskih vzorcev. Preglednica XXXIII prikazuje izmerjene vrednosti koncentracij ramiprila v plazemskih vzorcih bolnikov v časih 0 ur, 1 uro, 2 uri, 3 ure, 4ure in 5 ur po prejemu zadnjega odmerka zdravila, preglednica XXXIV pa istovrstne rezultate za ramiprilat.

Preglednica XXXIII: Plazemske koncentracije (ng/mL) ramiprila bolnikov.

t/b*	0h	1h	2h	3h	4h	5h
k2	0,42	16,75	4,22	2,12	1,46	1,45
k3	0,42	3,41	1,16	0,54	0,38	0,31
k6	0,36	8,40	2,84	2,15	1,66	/
k8	0,07	11,22	4,23	1,32	1,49	/
k9	0,65	7,85	1,43	/	0,52	/
k11	0,05	1,91	0,64	0,35	0,40	0,22
k14	0,22	9,30	2,18	0,81	0,43	/
k15	0,06	3,68	0,78	0,30	0,32	0,11
k16	0,10	2,69	0,71	0,36	0,19	0,14
k17	0,01	5,00	1,03	/	0,35	0,20
k18	0,00	4,10	1,18	0,65	0,23	/
k20	0,00	2,62	1,24	0,43	0,22	/

\*b.....oznaka bolnika, t.....čas odvzema vzorca glede na zadnji prejeti odmerek zdravila

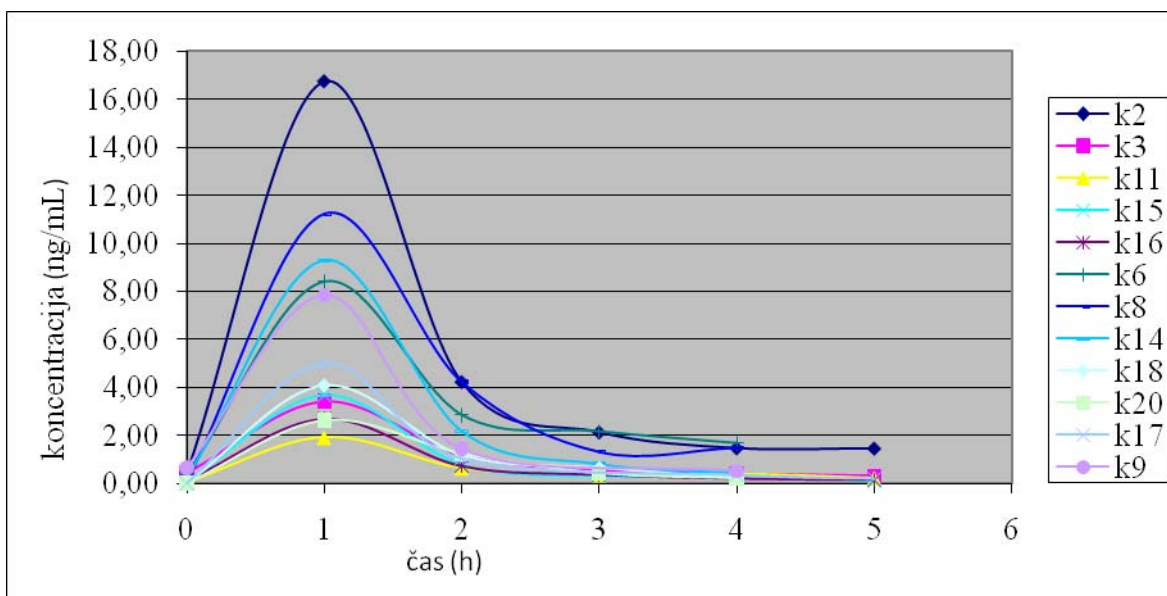
Preglednica XXXIV: Plazemske koncentracije (ng/mL) ramiprilata bolnikov.

t/b*	0h	1h	2h	3h	4h	5h
k2	8,15	22,05	23,49	19,93	16,67	14,63
k3	9,16	36,99	30,73	26,09	22,35	17,89
k6	4,20	9,20	13,51	15,46	15,67	/
k8	8,13	24,81	24,43	25,32	31,80	/
k9	9,90	15,02	21,04	/	14,74	/
k11	2,00	2,98	3,60	3,92	4,28	4,14
k14	12,45	16,24	20,00	19,38	21,63	/
k15	4,76	20,73	21,54	18,16	16,50	13,03
k16	6,50	31,79	29,35	24,23	17,44	14,58
k17	10,31	52,34	55,79	/	44,95	35,15
k18	2,80	28,83	23,79	20,47	16,18	/
k20	3,10	4,04	7,31	7,90	7,53	/

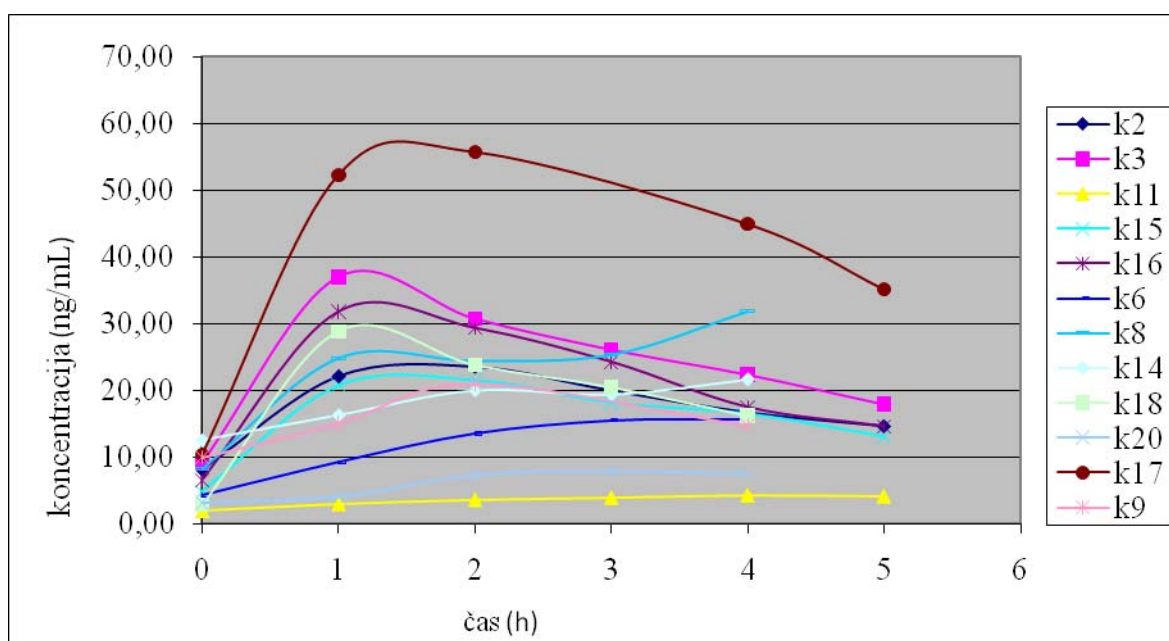
\*b.....oznaka bolnika, t.....čas odvzema vzorca glede na zadnji prejeti odmerek zdravila

Iz dveh preglednic je razvidno, da so koncentracije ramiprila v plazemskih vzorcih bolnikov, odvzetih v času  $t = 0$  zelo nizke, saj je v teh primerih od prejema zadnjega odmerka zdravila preteklo že 12 ali 24 ur in se je večina učinkovine metabolizirala v ramiprilat. Posledično so bile koncentracije ramiprilata izmerjene v teh vzorcih ( $t = 0$ ) višje. Zato smo na umeritveni premici pri merjenju koncentracij ramiprila v realnih plazemskih vzorcih upoštevali tudi koncentracijo 0,25 ng/mL, čeprav je sicer območje linearnosti med 0,5 ng/mL in 200 ng/mL. Pri tem smo določili tudi ustrezen determinacijski koeficient ( $r^2$ ) in potrdili točnost izmerjenih koncentracij. Vse ostale izmerjene koncentracije pa so bile v območju linearnosti.

Gibanje izmerjenih koncentracij smo ponazorili tudi grafično. Slika 8 prikazuje spreminjanje koncentracij ramiprila v plazemskih vzorcih posameznih bolnikov v odvisnosti od časa; slika 9 pa istovrstne podatke za ramiprilat.



Slika 8: Grafični prikaz spreminjanja plazemskih koncentracij ramiprila pri različnih bolnikih v odvisnosti od časa.



Slika 9: Grafični prikaz spreminjanja plazemskih koncentracij ramiprilata pri različnih bolnikih v odvisnosti od časa.

Po peroralni uporabi se ramipril hitro absorbira iz prebavil in doseže najvišjo koncentracijo v plazmi že v eni uri. Ramiprilat, ki je njegov edini aktivni presnovek pa doseže najvišjo plazemsko koncentracijo od 2 do 4 ure po zaužitju zdravila (5). Z našo analizo plazemskih vzorcev bolnikov smo ugotovili precej podoben trend gibanja koncentracij kot jih navaja strokovna literatura. Vidimo da je pri vseh bolnikih najvišja koncentracija ramiprila v plazmi eno uro po zaužitju odmerka zdravilne učinkovine, nato pa strmo pade (slika 8). Na sliki 9 pa vidimo, da so koncentracije ramiprilata skoraj pri vseh preiskovanih bolnikih najvišje v časovnem območju od druge do četrte ure po prejetju odmerka zdravila.

Po enkratnem 10 mg odmerku ramiprila so pri zdravih prostovoljcih koncentracije ramiprila v plazmi najvišje 1 ali 2 uri, ramiprilata pa 4 ure po prejetju omenjenega odmerka zdravilne učinkovine. Tudi v tem primeru se koncentracije ramiprila in ramiprilata v odvisnosti od časa ujemajo z objavljenimi podatki (14, 15).

Zaradi jemanja različnih odmerkov zdravilne učinkovine so bile različne tudi izmerjene koncentracije v plazmi preučevanih bolnikov. Vzroki ugotovljenih variabilnosti plazemskih koncentracij pa so lahko tudi: zmanjšano delovanje jeter ali ledvic ter nepravilno jemanje zdravila. Splošna ugotovitev torej je, da se plazemske koncentracije

ramiprila v odvisnosti od časa znižujejo, saj se razmeroma hitro presnavlja v aktivni ramiprilat, katerega koncentracije se zato s časom zvišujejo.

## 5 SKLEPI

Na osnovi izsledkov naše diplomske naloge lahko zapišemo naslednje sklepe:

- Za sočasno analizo plazemskih koncentracij ramiprila in ramiprilata smo razvili in validirali občutljivo metodo LC – MS/MS.
- Plazemske vzorce analita smo očistili nečistot in drugih potencialno motečih komponent v plazmi, in sicer z optimizirano metodo ekstrakcije na trdnem nosilcu (SPE). Izkoristek tega postopka je bil pri obeh analitih in njunih IS zelo dober ( $\geq 98,3\%$ ) in ponovljiv pri različnih koncentracijah. Zato sklepamo na ustreznost priprave vzorca v širšem koncentracijskem območju.
- Naša nova analizna metoda za določanje ramiprila in ramiprilata v plazemskih vzorcih je linearna v območju od 0,5 ng/mL do 200 ng/mL. V to območje pa se uvrščajo tudi predvidene plazemske koncentracije ramiprila in ramiprilata bolnikov, ki se zdravijo zaradi srčnega popuščanja.
- Točnost nove metode je dobra, saj smo pri vseh uporabljenih koncentracijah vzorcev QC ugotovili  $\leq 15\%$  odstopanje od pravih vrednosti.
- Tako znotrajdnevna kot meddnevna ponovljivost meritev je bila pri obeh analitih znotraj predvidenih meja.
- Dokazali smo tudi, da je pri uporabljeni metodi ekstrakcije obeh analitov učinek matrice zanemarljiv.
- Ramipril in ramiprilat ostaneta stabilna po treh ciklih zamrzovanja in odtajevanja, ter po 6 urah shranjevanja bodisi na sobni temperaturi ali v vzorčevalniku na 4 °C.
- Analizna metoda, ki smo jo razvili za sočasno določevanje ramiprila in ramiprilata v plazemskih vzorcih, se je izkazala kot primerna za zanesljivo določanje njunih koncentracij v plazemskih vzorcih bolnikov s srčnim popuščanjem.

## 6 LITERATURA

1. Cleland JG, Erhardt L, Murray G, Hall AS, Ball SG: Effect of ramipril on morbidity and mode of death among survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. A report from the AIRE Study Investigators. *European Heart Journal* 1997, 18(1):41-51.
2. Raphael C, Briscoe C, Davies J, Whinnett ZI, Manisty C, Sutton R, Mayet J, and Francis DP: Limitations of the New York Heart Association functional classification system and self-reported walking distances in chronic heart failure. *Heart*. 2007 April; 93(4): 476–482.
3. Lindenfeld J, Albert NM, Boehmer JP, Collins SP, Ezekowitz JA, Givertz MM, Klapholz M, Moser DK, Rogers JG, Starling RC, Stevenson WG, Tang WHW, Teerlink JR, Walsh MN. Executive Summary: HFSA 2010 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline. *J Card Fail* 2010; 16:475–539.
4. Lu XY, Shen-Tu JZ, Liu J: High-performance liquid chromatography-mass spectrometric analysis of ramipril and its active metabolite ramiprilat in human serum: application to a pharmacokinetic study in the Chinese volunteers. *J Pharm Biomed Anal*. 2006 Feb 13; 40(2): 478-83
5. <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-007598.pdf&dir=smpc>  
Dostopano: januar 2013
6. Brewster UC, Perazella MA: The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *The American Journal of Medicine*, Volume 116, Issue 4, 2004, 263–272
7. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00178> Dostopano: januar 2013
8. [http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB7231407\\_EN.htm](http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB7231407_EN.htm)  
Dostopano: januar 2013



9. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelc P, Koželj M: Interna medicina, 4. izdaja, Littera picta, Ljubljana 2011: 171-184
10. Elsebaei F, Zhu Y: Fast gradient high performance liquid chromatography method with UV detection for simultaneous determination of seven angiotensin converting enzyme inhibitors together with hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms and spiked human plasma and urine. *Talanta* 2011; 85(1): 123-9
11. Gupta VK, Jain R, Lukram O, Agarwal S, Dwivedi A.: Simultaneous determination of ramipril, ramiprilat and telmisartan in human plasma using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 2011; 83(3): 709-16
12. Tan A, Jin W, Deng F, Hussain S, Musuku A, Massé R: Bioanalytical method development and validation using incurred samples--simultaneous quantitation of ramipril and ramiprilat in human EDTA plasma by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 877(29): 3673-80
13. Gowda KV, Mandal U, Senthamil Selvan P, Sam Solomon WD, Ghosh A, Sarkar AK, Agarwal S, Nageswar Rao T, Pal TK: Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of metoprolol tartrate and ramipril in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 858(1-2): 13-21.
14. Pudage A, Kamat S: Development and validation of UPLC tandem mass spectrometry assay for separation of a phase II metabolite of ramipril using actual study samples and its application to a bioequivalence study. *Biomed Chromatogr.* 2011; 25(6): 664-73
15. Zhu Z, Vachareau A, Neirinck L: Liquid chromatography-mass spectrometry method for determination of ramipril and its active metabolite ramiprilat in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002; 779(2): 297-306
16. Elsebaei F, Zhu Y: Fast gradient high performance liquid chromatography method with UV detection for simultaneous determination of seven angiotensin converting enzyme inhibitors together with hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms and spiked human plasma and urine. *Talanta*, 2011; 85(1): 123-9
17. Bonazzi D, Gotti R, Andrisano V, Cavrini V: Analysis of ACE inhibitors in pharmaceutical dosage forms by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). *J Pharm Biomed Anal.* 1997; 16(3): 431-8.

18. Guyton AC, Hall JE: Textbook of Medical Physiology, 10<sup>th</sup> Ed., Elsevier Saunders; USA Philadelphia, Pennsylvania, 2001: 333-334
19. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: Pharmacology, 5<sup>th</sup> Ed., Churchill Livingstone, 2003: 290-292, 296-297
20. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Rockville, MD, 2001
21. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM: Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC – MS/MS. Anal. Chem. 2003; 75: 3019-30
22. Van Eckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, et.al.: Validation of bioanalytical LC- - MS/MS assays: evaluation of matrix effects. J. Chromatogr. B 2009; 877: 2198 – 207
23. European Pharmacopoeia, 7<sup>th</sup> Ed.; Volume 1, 2011: 67-69, Volume 2, 2011: 2843-2845
24. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR: Principles of Instrumental Analysis, 6<sup>th</sup> Ed., Thomson Brooks/Cole; 2007; 550-575, 817-849
25. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR: Introduction to spectroscopy, 4<sup>th</sup> Ed., Washington, 2009; 418-434
26. Panchal HJ, Suhagina BN: Simultaneous determination of atorvastatin calcium and ramipril in capsule dosage forms by high - performance liquid chromatography and high – performance thin layer chromatography. J AOAC Int. 2010;93(5):1450-7
27. [www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X/X-C](http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X/X-C), Strong Cation Mixed Mode Dostopano januar 2013
28. Heintz B, Verho M, Brockmeier D, Lückel G, Maigatter S, Sieberth HG, Rangoonwala B, Bender N: Multiple-dose pharmacokinetics of ramipril in patients with chronic congestive heart failure. J Cardiovasc Pharmacol.1993;22 Suppl9:36-42
29. Burnier M, Brunner HR: Angiotensin II receptor antagonists, The Lancet 2000;355:637-47