

**U N I W E R S Y T E T J A G I E L L O Ń S K I  
C O L L E G I U M M E D I C U M**

**Maria Walczak**

**OCENA FARMAKOKINETYKI ACEBUTOLOLU W  
ASPEKCIE CHIRALNEJ BUDOWY TEGO LEKU**

**Praca doktorska**

**PROMOTOR: DR HAB. JOANNA SZYMURA-OLEKSIK**

Bibl. Medyczna CM UJ



1816019151

**Pracę wykonano w Zakładzie Farmakokinetyki  
i Farmacji Fizycznej CM UJ**

**KRAKÓW 2000**

*Pani Doc. dr hab. Joannie Szymurze – Oleksiak  
składam serdeczne podziękowania za nieustrudzoną  
pomoc, życzliwość oraz wiele cennych uwag podczas  
wykonywania niniejszej pracy.*

*Bardzo dziękuję*

*Pani Prof. dr hab. Kalinie Kaweckiej – Jaszcz,  
Pani dr med. Bogumile Bacior oraz  
Panu lek. med. Januszowi Kochmanowi za  
udostępnienie materiału klinicznego.*

*Pragnę podziękować*

*Panu Doktorowi Wojciechowi Jawieniowi  
za pomoc w opracowaniu statystycznym wyników  
niniejszej pracy.*

*Maria Walczak*

## *Spis treści*

1. Wstęp.....	6
1.1. Charakterystyka farmakokinetyczna leków $\beta$ -adrenolitycznych.....	8
1.1.1. Wchłanianie.....	8
1.1.2. Dystrybucja.....	9
1.1.3. Metabolizm i wydalanie.....	10
1.1.4. Enancjoselektywna farmakokinetyka $\beta$ -adrenolityków.....	13
1.2. Achiralne metody oznaczania acebutololu oraz diacetololu w materiale biologicznym.....	15
1.3. Chiralne metody oznaczania acebutololu oraz diacetololu w materiale biologicznym.....	16
1.4. Kryteria walidacji metod analitycznych w HPLC.....	21
1.5. Kryteria rozdzielenia chromatograficznego.....	23
2. Cel pracy.....	25
3. Część doświadczalna.....	27
3.1. Metodyka badań.....	27
3.1.1. Związki będące przedmiotem badań.....	27
3.1.2. Standardy wewnętrzne.....	27
3.1.3. Odczynniki stosowane w badaniach.....	27
3.1.4. Roztwory stosowane w badaniach.....	28
3.1.5. Aparatura.....	29
3.1.6. Materiał biologiczny.....	30
3.2. Metodyka ekstrakcji badanych związków z materiału biologicznego.....	30
3.3. Metody analityczne.....	31
3.3.1. Oznaczanie stężeń racemicznego AC i DC metodą achiralną.....	31
3.3.2. Oznaczanie stężeń enancjomerów AC i DC metodą pośrednią.....	32
3.3.3. Oznaczanie stężeń enancjomerów AC i DC metodą bezpośrednią z zastosowaniem detekcji UV-VIS.....	33
3.3.4. Oznaczanie stężeń enancjomerów AC i DC metodą bezpośrednią z zastosowaniem detekcji spektrofluorymetrycznej.....	33

3.4.	<i>Analiza stężeń stacjonarnych racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów w osoczu i pełnej krwi chorych.....</i>	34
3.4.1.	<i>Pacjenci.....</i>	34
3.5.	<i>Obliczenia farmakokinetyczne.....</i>	35
3.6.	<i>Badanie wiązania racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów z erytrocytami.....</i>	36
3.6.1.	<i>Metodyka badań w warunkach in vivo.....</i>	36
3.6.2.	<i>Metodyka badań w warunkach in vitro.....</i>	37
4.	<i>Wyniki.....</i>	38
4.1.	<i>Warunki analizy oraz walidacja achiralnej metody oznaczania racemicznego AC i DC.....</i>	38
4.1.1.	<i>Warunki analizy.....</i>	38
4.1.2.	<i>Walidacja metody.....</i>	41
5.1.	<i>Warunki analizy oraz walidacja pośredniej metody oznaczania enancjomerów AC i DC.....</i>	50
5.1.1.	<i>Warunki analizy.....</i>	50
5.1.2.	<i>Walidacja metody.....</i>	51
6.1.	<i>Warunki analizy oraz walidacja bezpośredniej metody oznaczania enancjomerów AC i DC z zastosowaniem detekcji UV-VIS.....</i>	59
6.1.1.	<i>Warunki analizy.....</i>	59
6.1.2.	<i>Walidacja metody.....</i>	61
7.1.	<i>Warunki analizy oraz walidacja bezpośredniej metody oznaczania enancjomerów AC i DC z zastosowaniem detekcji spektrofluorymetrycznej.....</i>	68
7.1.1.	<i>Warunki analizy.....</i>	68
7.1.2.	<i>Walidacja metody.....</i>	70
8.1.	<i>Ocena farmakokinetyki AC oraz DC u chorych na podstawie stężeń oznaczanych metodą achiralną.....</i>	84
8.2.	<i>Ocena farmakokinetyki enancjomerów AC oraz DC u chorych na podstawie stężeń oznaczanych metodą chiralną.....</i>	89

8.3. <i>Analiza wiązania racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów z erytrocytami</i> .....	94
8.3.1. <i>Ocena wiązania w warunkach in vivo</i> .....	94
8.3.2. <i>Ocena wiązania w warunkach in vitro</i> .....	97
9. <i>Dyskusja wyników</i> .....	100
10. <i>Wnioski</i> .....	108
11. <i>Piśmiennictwo</i> .....	109
12. <i>Spis rycin</i> .....	120
13. <i>Spis tabel</i> .....	125

## ***Wykaz skrótów i symboli stosowanych w pracy***

AC – acebutolol

DC – diacetolol

IS – HC 36096

PI – pindolol

PR – propranolol

S(+)-NEIC – (+) izocyjanian (S) -1- naftyloetylu

LC – MS – chromatograf cieczowy połączony ze spektrometrem masowym

MCL – cieczowa chromatografia micelarna

RP – HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych

IPC – chromatografia par jonowych

MECC – micelarna, elektrokinetyczna chromatografia kapilarna

DAD – diode – array detektor

k – współczynnik pojemnościowy

$\alpha$  - współczynnik rozdzielania

$R_s$  – zdolność rozdzielcza

LOD – dolna granica wykrywalności

LOQ – dolna granica oznaczalności

$C_{\max}$  – stężenie maksymalne

$C_{\min}$  – stężenie minimalne

$t_{\max}$  – czas po którym osiągnane jest stężenie maksymalne

AUC – pole pod krzywą stężenie – czas

$K_e$  – stała szybkości eliminacji

$t_{0.5}$  – biologiczny okres półtrwania

f – procent wiązania leku z erytrocytami

$K_{E/O}$  – współczynnik podziału leku erytrocyty/osocze.

## 1. Wstęp

Chiralność stanowiąca fundamentalną cechę układów biologicznych powoduje, że oddziaływanie pomiędzy tymi układami a wieloma lekami, należącymi do różnych grup farmakologicznych (np. leki przeciwnowotworowe, psychotropowe, przeciwzapalne, antybiotyki,  $\beta$ -adrenolityki) charakteryzuje wysoka stereowybiórczość. Oddziaływanie to może obejmować takie makrocząsteczki jak: glikolipidy, polinukleotydy, enzymy a przede wszystkim białka receptorowe oraz transportujące i wiążące leki.

Analizując stereowybiórczy charakter procesu oddziaływania leków chiralnych z receptorami można wyróżnić następujące grupy.

Pierwsza obejmuje leki, w przypadku których obydwa enancjomery wykazują takie samo działanie farmakologiczne a różnią się jedynie siłą tego działania, przykładem może być [44]:

- warfaryna, izomer S(-) działa silniej przeciwzakrzepowo w porównaniu do izomeru R(+),
- ibuprofen, izomer S(+) działa silniej przeciwzapalnie w porównaniu do izomeru R(-),
- fluoksetyna, izomer S(+) działa silniej przeciwdepresyjnie w porównaniu do izomeru R(-).

Drugą grupę stanowią leki w przypadku których tylko jeden z enancjomerów jest aktywny farmakologicznie, przykładem może być: S(-) nitrendypina, S(-) felodypina, S(-) atenolol, S(-) propranolol oraz R(+) chloramfenikol [49].

Do trzeciej grupy należą leki w przypadku których obydwa enancjomery są aktywne ale wykazują odmienne działanie farmakologiczne i toksyczne, np:

- fenfluramina, izomer S(+) hamuje wychwyt zwrotny 5-HT, wykazując działanie anorektyczne, podczas gdy izomer R(-) wpływa na receptory noradrenergiczne i dopaminergiczne,
- etambutol, izomer S(+) wykazuje działanie tuberkulostatyczne, natomiast izomer R(-) odpowiada za uszkodzenie nerwu wzrokowego,

- mianseryna, izomer S(+) odpowiada za działanie przeciwdepresyjne, podczas gdy izomer R(-) wywiera działanie cytotoksyczne,
- ketamina, izomer S(+) odpowiedzialny jest za działanie znieczulające, natomiast izomer R(-) działa pobudzająco na OUN,
- barbiturany, izomery S(-) działają depresyjnie na OUN, natomiast izomery R(+) wykazują działanie pobudzające [129].

Stereochemiczne różnice pomiędzy enancjomerami odpowiadają za odmienne ich powinowactwo do receptorów, czego rezultatem jest, jak przedstawiono na podanych powyżej przykładach odmienny efekt farmakologiczny a wskutek tego również działanie terapeutyczne oraz toksyczne [26, 93, 94].

W wyniku enancjoselektywnego oddziaływania leków chiralnych ze środowiskiem biologicznym, enancjomery mogą wykazywać nie tylko zróżnicowaną aktywność farmakodynamiczną ale także różne właściwości farmakokinetyczne. Znajomość tych zagadnień pozwala z jednej strony na poszukiwanie nowych, bardziej specyficznie działających leków a z drugiej na właściwą interpretację zależności stężenie-efekt (dawka-efekt) w przypadku leków chiralnych już stosowanych [10, 68, 121].

Stereoselektywność farmakokinetyki leków wpływająca na stężenie poszczególnych enancjomerów w pobliżu receptora może stanowić jeden z istotnych czynników warunkujących międzyosobnicze różnice w działaniu klinicznym leku, obserwowanym po podaniu związku racemicznego [23].

Enancjoselektywny charakter procesów farmakokinetycznych, takich jak: wchłanianie, dystrybucja oraz eliminacja leku może stanowić przyczynę dużych międzyosobniczych różnic stosunku stężeń bardziej aktywnego enancjomeru do mniej aktywnego, czyli stosunku stężeń eutomeru do distomeru. Szczególną rolę w tym przypadku odgrywa metabolizm leków katalizowany przez izoenzymy cytochromu P-450 [49, 70].

Uwzględniając stereoselektywny charakter przebiegu procesów metabolicznych można wyróżnić następujące przypadki:



- lek niechiralny ulega przekształceniu w chiralny metabolit, jako przykład może posłużyć aromatyczna oksydacja fenytoiny do 4-hydroksyfenytoiny lub pentoksyfilina ulegająca przemianie do jej hydroksylowej pochodnej [93],
- lek chiralny przekształcany jest w chiralny metabolit, przykładem jest acebutolol i jego metabolit diacetolol [35],
- lek chiralny przechodzi w metabolit diastereoizomeryczny, np. etodolak ulegający glukuronizacji do glukuronowej formy diastereoizomerycznej [72],
- lek chiralny przekształcany jest w niechiralny metabolit, np. aromatyzacja cząsteczki nilvadypiny lub dezaminacja amfetaminy do fenyloacetonu [113],
- lek chiralny przekształcany jest w wyniku inwersji, np. przekształcenie izomeru R(-) ibuprofenu w jego antypodę S(+) lub inwersja R(+) stiripentolu w izomer S(-) [44].

Wśród związków intensywnie badanych w aspekcie chiralności znajdują się leki z grupy  $\beta$ -adrenolityków. Wykazano, że działanie blokujące receptory  $\beta$ -adrenergiczne posiadają enancjomery tych związków o konfiguracji absolutnej S(-). Autorzy wielu prac przyjmują, że enancjomery te są od 50 do 500 razy silniejszymi antagonistami amin katecholowych w porównaniu do form o konfiguracji R(+) [75, 78, 79, 85, 131].

## ***1.1. Charakterystyka farmakokinetyczna leków $\beta$ -adrenolitycznych***

### **1.1.1. Wchłanianie**

Leki  $\beta$ -adrenolityczne w zdecydowanej większości wchłaniają się prawie całkowicie z przewodu pokarmowego, mimo to dostępność biologiczna tych związków jest zróżnicowana osobniczo i waha się od 10 do 100 % [43, 105, 109]. Przyczyną małej dostępności biologicznej wielu  $\beta$ -adrenolityków jest duży efekt pierwszego przejścia tych leków przez wątrobę. Zjawisku temu ulegają przede wszystkim związki dobrze rozpuszczalne w tłuszczach, takie jak: propranolol, labetalol i oksprenolol. W przypadku leków średnio lub słabo rozpuszczalnych w

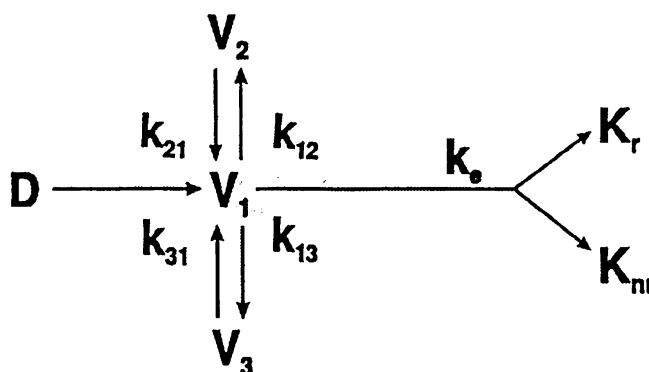
tuszczach, do których zalicza się acebutolol, metoprolol i tymolol, efekt ten jest słabiej zaznaczony. Podczas pierwszego przejścia przez wątrobę powstają czynne metabolity, których właściwości farmakologiczne mogą różnić się od właściwości substancji macierzystej, jak zaobserwowano w przypadku 4-hydroksypropranololu lub wykazują takie same właściwości jak związek macierzysty, jak w przypadku diacetololu [9].

Acebutolol charakteryzuje się szybkim lecz nie całkowitym wchłanianiem z przewodu pokarmowego. Po doustnym podaniu tego leku, wchłonięciu ulega około 70% podanej dawki. Stężenie maksymalne ( $C_{max}$ ) acebutololu w surowicy krwi pojawia się po 2-4 h od chwili jego podania. U chorych cierpiących na arytmie serca stężenie to osiągane jest szybciej, już po upływie 1-1.5 h [33].

Dostępność biologiczna acebutololu jest jednak stosunkowo niska i zróżnicowana osobniczo. Waha się w granicach 34-50% i jest wynikiem metabolizmu tego leku w wątrobie podczas efektu pierwszego przejścia. Stwierdzono, że u ludzi w podeszłym wieku dostępność biologiczna acebutololu zwiększa się prawie dwukrotnie [43].

### 1.1.2. Dystrybucja

Po podaniu dożylnym przebieg zmian stężenia leków  $\beta$ -adrenolitycznych w surowicy krwi wykazuje charakter trójfazowy i może być opisany zgodnie z otwartym modelem trójkompartmentowym, (ryc. 1) [110].



*Rycina 1. Schemat otwartego modelu trójkompartmentowego opisującego dystrybucję leków  $\beta$ -adrenolitycznych w organizmie.*

Zgodnie z tym modelem można wyróżnić 3 fazy:

- fazę  $\alpha$ , która odpowiada szybkiej dystrybucji leku w kierunku silnie ukrwionych tkanek kompartmentu centralnego, ( $t_{0,5} = 2.6$  h),
- fazę  $\beta$ , która odpowiada przenikaniu leku z kompartmentu centralnego do tkankowego oraz jego eliminacji z organizmu, ( $t_{0,5} = 4.1$  h),
- fazę  $\gamma$ , która jest wynikiem redystrybucji leku z tkanek do krwi, ( $t_{0,5} = 8.8$  h).

Objętość dystrybucji leków  $\beta$ -adrenolitycznych jest zróżnicowana i waha się pomiędzy 1 a 100 L/kg [109].

Objętość dystrybucji acebutololu w stanie stacjonarnym wyznaczona u zdrowych ochotników, po podaniu dożylnym tego leku waha się pomiędzy  $1.17 \pm 0.4$  L/kg a  $3.0 \pm 0.8$  L/kg, jednak dla realnego jej określenia należy uwzględnić wartość hematokrytu i procent wiązania tego leku z erytrocytami [83, 88, 89].

Leki  $\beta$ -adrenolityczne w różnym stopniu wiążą się z białkami osocza, silnie (około 90 %) wiąże się propranolol, penbutolol, pindolol, labetalol i bisoprolol [73], natomiast słabo (poniżej 30 %) wiąże się acebutolol, atenolol, metoprolol, tymolol i sotalol [59, 91].

Wiązanie acebutololu z białkami osocza rzędu 11 do 19% jest niezależne od dawki leku i nie ma istotnego znaczenia klinicznego [29]. Istotne znaczenie może odgrywać natomiast wiązanie acebutololu z erytrocytami, które wynosi około 50% [28, 87].

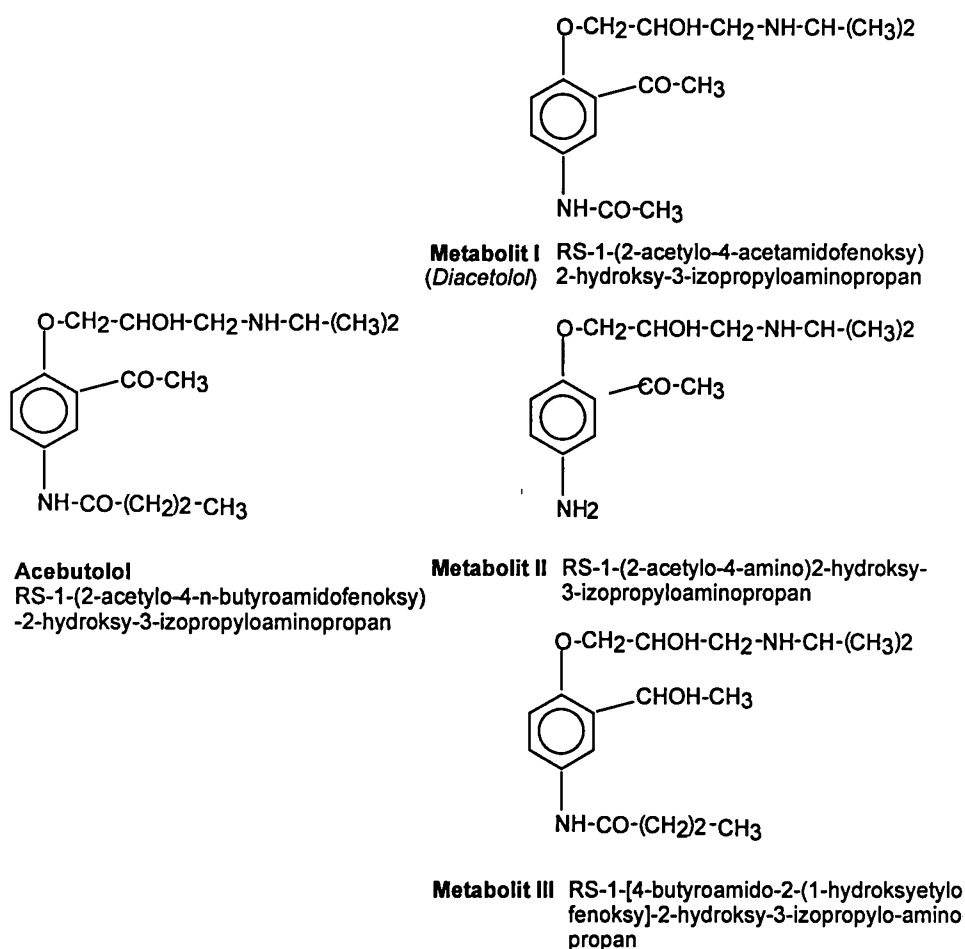
### 1.1.3. Metabolizm i wydalanie

Leki  $\beta$ -adrenolityczne o właściwościach lipofilnych, wykazujące duży efekt pierwszego przejścia, eliminowane są z organizmu na drodze metabolizmu wątrobowego, natomiast leki o właściwościach hydrofilnych eliminowane są głównie przez nerki [18].

Acebutolol jest eliminowany z organizmu zarówno na drodze biotransformacji (50 – 60 %), jak również wydalania nerkowego (30 – 40 %) [20, 66].

Podczas pierwszego przejścia przez wątrobę lek ten jest metabolizowany do aktywnego farmakologicznie metabolitu, jakim jest diacetolol. Dzieje się tak na skutek hydrolizy wiązania amidowego grupy butyryloamidowej stanowiącej łańcuch boczny pierścienia benzenu do wolnej aminy aromatycznej. Postać ta jest następnie szybko przekształcana w procesie N-acetylowania do głównego metabolitu jakim jest diacetolol. Szybkość biotransformacji acebutololu w poszczególne metabolity nie jest uwarunkowana genetycznie [45, 46].

Schematyczny przebieg procesu metabolizmu acebutololu przedstawiono na rycinie 2.



Rycina 2. Schemat obrazujący główne drogi metabolizmu acebutololu.

Klirens całkowity acebutololu ( $Cl_T$ ) wynosi  $6.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , klirens osoczowy ( $Cl_O$ )  $4.59 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , klirens nerkowy ( $Cl_N$ )  $2.95 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , a klirens pozanerkowy ( $Cl_{NR}$ )  $4.75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$  [65].

Wydalenie nerkowe acebutololu jest niezależne od pH moczu, istotne znaczenie odgrywa natomiast niewydolność nerek, która w dużym stopniu upośledza przede wszystkim wydalenie metabolitu [67, 84].

Leki  $\beta$ -adrenolityczne różnią się biologicznym okresem półtrwania. Wykazano, że dla większości z nich (propranolol, metoprolol, bewantolol, karteolol, celiprolol, labetalol, oksprenolol, pindolol, tymolol)  $t_{0.5}$  jest stosunkowo krótki i wynosi od 2 do 6 godzin, jednak powstające aktywne metabolity mogą znacznie przedłużać ich działanie. Do długo działających  $\beta$ -adrenolityków należą: nadolol, betaksolol, bisoprolol, penbutolol, praktolol, sotalol, ich biologiczny okres półtrwania waha się od 10 do 22 godzin [35].

Biologiczny okres półtrwania acebutololu u osób zdrowych waha się od 1.6 do 1.8 h. W schorzeniach nerek i wątroby  $t_{0.5}$  acebutololu wzrasta o 30 %, natomiast diacetololu może wzrosnąć nawet o 60 % w stosunku do populacyjnych wartości okresu półtrwania [130].

Diacetolol jest podobnie jak lek macierzysty aktywny farmakologicznie, w porównaniu z acebutololem działa jednak bardziej kardioselektywnie. Po podaniu dożylnym acebutololu stężenia jego metabolitu w osoczu są niższe w porównaniu do stężeń leku macierzystego, natomiast po podaniu doustnym stężenia metabolitu w osoczu w stanie stacjonarnym mogą przewyższać dwu- a nawet trzykrotnie stężenia leku macierzystego [46].

Ponieważ diacetolol posiada silniejsze właściwości hydrofilowe, dlatego też słabiej przenika przez barierę krew płyn mózgowo-rdzeniowy oraz wykazuje niższy niż lek macierzysty procent wiązania z białkami osocza wynoszący zaledwie 6-9 % [29].

Diacetolol wydalany jest przede wszystkim na drodze eliminacji nerkowej, dlatego też w przypadku niewydolności nerek, związek ten ulega znacznej kumulacji w organizmie chorych [84].

#### 1.1.4. Enancjoselektywna farmakokinetyka $\beta$ -adrenolityków

Chemicznie wszystkie  $\beta$ -adrenolityki występują jako stereoizomery i na ogół podawane są w postaci racemicznej, z wyjątkiem tymololu i penbutololu. Badania farmakokinetyki tych leków wykazały, że wiele z nich charakteryzuje enancjoselektywny charakter procesów ich dyspozycji w organizmie [15, 80].

Na uwagę zasługują badania dotyczące farmakokinetyki propranololu w których stwierdzono, że wiązanie tego leku z białkami osocza ma charakter stereoselektywny. Enancjomer S(-) w większym stopniu wiąże się z kwaśną  $\alpha_1$ -glikoproteina niż jego antypoda. W przypadku albuminy zależność ta przedstawia się odwrotnie. Ilustrują to stosunki stężeń wolnej frakcji S(-)/R(+), które w obecności kwaśnej  $\alpha_1$ -glikoproteiny oraz albuminy wynosiły odpowiednio 0.79:1 oraz 1.1:1 [55, 81].

Stereoselektywny charakter procesu metabolizmu propranololu powodował, że po podaniu doustnym tego leku stężenie enancjomeru S(-) przewyższało o około 40 - 90 % stężenie jego antypody. Jest to wynikiem wzmożonej eliminacji enancjomeru R(+) propranololu a także wspomnianego wyżej, silnego wiązania izomeru S(-) z kwaśną  $\alpha_1$ -glikoproteina. Wiązanie to powoduje, że tylko niewielki ułamek wolnej frakcji leku dostępny jest dla procesu metabolizmu [58, 99, 114, 119].

Badania *in vitro* oraz *in vivo* nad metabolizmem metoprololu wykazały również enancjoselektywny charakter tego procesu, katalizowanego przez izoenzym CYP2D6. Dotyczy to osobników szybko metabolizujących, u których klirens enancjomeru R(+) był większy od jego antypody S(-). Wskutek tego stężenia w surowicy krwi enancjomeru S(-), czyli eutomeru było wyższe niż distomeru. U osobników wolno metabolizujących klirensy obydwu enancjomerów były podobne, tym samym stężenia ich we krwi w tej populacji nie różniły się w sposób istotny.

Z powyższych przyczyn, aby uzyskać ten sam efekt farmakodynamiczny populacja chorych wolno metabolizujących wymagała wyższych stężeń

racemicznego metoprololu w porównaniu z osobnikami szybko metabolizującymi [24, 76, 77, 82, 92, 120].

Podobnie w przypadku innych  $\beta$ -adrenolityków, np. bewantololu [118], labetalolu [48, 61], atenololu [36, 69, 116] bisoprololu [57] oraz karwedilolu [90] obserwowano enancjoselektywny charakter ich dyspozycji w organizmie.

Właściwa ocena oraz interpretacja stężeń tego typu leków wymaga więc zastosowania enancjoselektywnych metod analitycznych do ich oznaczania.

Dotychczasowe badania dotyczące farmakokinetyki acebutololu i diacetololu z uwzględnieniem chiralnej budowy tego leku wykazały, że w grupie zdrowych ochotników, którym podawano jednorazowo dawkę racemicznego acebutololu, zaobserwowano zróżnicowanie wartości stężeń poszczególnych enancjomerów. Wartości te były znacznie wyższe dla izomeru S(-)AC w porównaniu z izomerem R(+)-AC tego leku.

Wykazano, że stosunek wartości AUC izomeru S(-)AC do R(+)-AC wynosił  $1.20 \pm 0.1$ . Wartości te korespondowały ze znacznie większym klirensem formy R(+)-AC wynoszącym  $106 \pm 30$  L/h, w porównaniu z klirensem izomeru S(-)AC równym  $87 \pm 22$  L/h.

Rozważając z kolei analogiczne zależności dla metabolitu acebutololu, wykazano, że stężenia maksymalne R(+)-DC były znacznie wyższe w porównaniu do stężeń S(-)-DC, stosunek izomerów S(-)-DC / R(+)-DC wynosił  $0.7 \pm 0.1$ . Natomiast biologiczny okres półtrwania równy  $8.8 \pm 2.4$  h był dłuższy dla izomeru S(-)-DC, natomiast dla izomeru R(+)-DC wynosił  $6.4 \pm 1.6$  h. Stwierdzono również, że klirens nerkowy dla izomeru R(+)-DC równy  $70 \pm 34$  mL/min był znacznie większy niż dla formy S(-)-DC wynoszący  $53 \pm 29$  mL/min [103, 104].

## 1.2. *Achiralne metody oznaczania acebutololu oraz diacetololu w materiale biologicznym*

Od czasu wprowadzenia acebutololu do leczenia chorób serca i układu krążenia w 1973 r do oznaczania stężeń tego leku, zarówno formy racemicznej, jak również enancjomerów wykorzystywano szereg metod analitycznych, takich jak: spektrofotometria, polarografia, chromatografia oraz metody enzymatyczne [41, 45, 46, 107, 125, 132]. Spośród opracowanych metod najbardziej przydatną okazała się wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), która pozwoliła na specyficzne oznaczanie zarówno leku macierzystego i jego metabolitu, jak również ich izomerów optycznych.

Przykładowe achiralne metody oznaczania acebutololu i diacetololu zebrano w tabeli 1.

**Tabela 1.** *Achiralne metody oznaczania acebutololu oraz diacetololu.*

Metody analityczne	Autorzy	Materiał biologiczny	Detektor długość fali [nm]	LOD [ng/mL]
LC - MS	Abdel M. [1]	roztwór metanolowy	MS	0.2-0.5
MCL	Carda S. [20]	mocz	Fluorymetr	0.5-28
RP-HPLC	Guentert T. [51]	pełna krew osocze krwi	UV-VIS 240	10
IPC oraz MECC	Luccari P. [81]	osocze krwi mocz	DAD	100
RP-HPLC	Ohshima T. [97]	osocze krwi	UV-VIS 232	-



### 1.3. *Chiralne metody oznaczania acebutololu oraz diacetololu w materiale biologicznym*

Najpopularniejszą i najszerzej stosowaną techniką enancjoselektywnego oznaczania leków jest wysokosprawna chromatografia cieczowa za pomocą której rozdział enancjomerów można przeprowadzić dwoma sposobami:

**I. Rozdział pośredni** - enancjomery związku reagują z chiralnym odczynnikiem upochadniającym (CDA-Chiral Derivatization Agent), tworząc pochodne diastereoizomeryczne, obdarzone odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi, które z kolei można rozdzielić stosując konwencjonalną, achiralną technikę chromatograficzną [16].

W rozdziale pośrednim enancjomerów, kluczowe znaczenie odgrywa dobór odpowiedniego, chiralnego odczynnika upochadniającego, który musi spełniać szereg kryteriów dotyczących: czystości i trwałości chemicznej oraz stereochemicznej, ponadto musi szybko reagować z odpowiednią grupą funkcyjną, z równą szybkością dla tych grup, selektywnie oraz w łagodnych warunkach. Detektor powinien także z jednakową czułością reagować na obydwa diastereoizomery.

W tworzeniu diastereoizomerów leków  $\beta$ -adrenolitycznych biorą udział dwie grupy funkcyjne: aminowa i rzadziej wykorzystywana alkoholowa [21].

W metodzie pośredniej, jako odczynniki upochadniające najczęściej stosuje się następujące grupy związków:

- Bezwodniki kwasowe, będące pochodnymi aminokwasów oraz kwasu winowego, np. bezwodnik tert-butoksykarbonylo-L-leucyny (t-BOC-Leu), bezwodnik tert-butoksykarbonylo-L-alaniny (t-BOC-Ala), bezwodnik karbobenzylloksy-L-proliny, bezwodnik kwasu (+)-di-O-benzoilowinowego oraz bezwodnik kwasu (+)-di-O-acetylowinowego (DATAAN) wszystkie stosowane z powodzeniem do upochadniania wielu leków  $\beta$ -adrenolitycznych [31].

- Chlorki kwasowe, pierwszym z tej grupy, który znalazł zastosowanie w pośrednim rozdziale  $\beta$ -adrenolityków był chlorek (-)-N-trifluoroacetylo-1-proliku,

(TPC). Odczynnik ten wykorzystywano m.in. do oznaczenia enancjomerów propranololu oraz acebutololu [128]. Innym powszechnie stosowanym odczynnikiem jest chlorek kwasu (1R)-kamforo-10-sulfonowego (CSC), który wykorzystywano do oznaczania enancjomerów atenololu [112].

- Cyjanki, reagujące z drugorzędową grupą alkoholową dając fluorescencyjne diastereoizomery, np. cyjanek (+)-2-metylo-1,1'-binaftaleno-2'-karbonylu, który tworzy diastereoizomeryczne estry z propranololem i penbutololem [34].

- Izocyjaniany oraz izotiocyjaniany, wśród których wyróżnia się (+)-izocyjanian (R)-1-fenyletylu (R-PEIC) i (-)-izocyjanian (S)-1-fenyletylu (S-PEIC), a także (+)-izocyjanian (S)-1-nafyletylu, (S-NEIC) i (-)-izocyjanian (R)-1-nafyletylu (R-NEIC) [21, 56, 74, 124], stosowane do oznaczania enancjomerów licznych leków  $\beta$ -adrenolitycznych w tym acebutololu i jego metabolitu diacetololu. Izocyjaniany reagują z pierwszo i drugorzędową grupą aminową tworząc pochodne mocznikowe, natomiast izotiocyjaniany odpowiednie pochodne tiomocznikowe. Chociaż izocyjaniany reagują także z drugorzędową grupą alkoholową tworząc karbaminiany, reakcja z grupą aminową zachodzi dużo łatwiej. Wadą odczynników izocyjanianowych jest ich wrażliwość na wilgoć, zaletą natomiast krótki czas potrzebny do przebiegu reakcji upochodnienia [42, 101, 102].

Za przykład odczynnika izotiocyjanianowego może posłużyć isotiocyjanian 2,3,4,6-tetra-O-acetylo- $\alpha$ -D-glukopiranozyli (TAGIT/GITC) [37, 115], stosowany m. in. do oznaczania enancjomerów albuterolu, isotiocyjanian 2-fenyletylo (R-PETC), wykorzystywany do oznaczania enancjomerów propranololu, isotiocyjanian 2,3,4-tri-O-acetylo- $\alpha$ -D-arabinozopiranozyli (AITC), stosowany do oznaczania enancjomerów pindololu, propranololu, atenololu, karwedilolu, metoprololu, bewantololu, oksprenololu i tymololu oraz (4S-cis)-2,2-dimetylo-5-izotiocyjaniano-4-fenyle-1,3-dioksan wykorzystywany do oznaczania enancjomerów labetalolu [32, 37, 115].

- Innym przykładem związków pozwalających na enancjoselektywny rozdział leków  $\beta$ -adrenolitycznych z zastosowaniem tzw. derywatywacji

przedkolumnowej są: chloroformat (+)-1-(9-fluorenylo)etylowy (FLEC), stosowany do rozdzielania enancjomerów metoprololu, atenololu i propranololu [108, 111] oraz chloroformat (-)-mentylowy (MCF), wykorzystywany do oznaczania enancjomerów atenololu, metoprololu, propranololu i sotalolu [44, 64]

**II. Rozdział bezpośredni** - polega na tworzeniu diastereoizomerów bezpośrednio na chiralnych fazach stacjonarnych, pokrytych odczynnikiem różnicującym (CSP - Chiral Stationary Phases) lub za pomocą chiralnych odczynników różnicujących dodawanych do fazy ruchomej (CMPA – Chiral Mobile Phase Additives) i utworzeniu w tym roztworze diastereoizomerów, różniących się trwałością oraz adsorbcją na fazie stacjonarnej kolumny achiralnej [17, 98].

W 1981 roku po raz pierwszy opublikowano pracę dotyczącą zastosowania fazy ruchomej zawierającej kwas (1R)-kamforo-10-sulfonowy (CSA) oraz N-benzoksykarbonylo-glicylo-L-prolinę (ZGP), działające na zasadzie tworzenia z rozdzielaną substancją kompleksów typu par jonowych [34, 62].

Najczęściej stosowaną techniką jest zróżnicowanie szybkości migracji enancjomerów związku na chiralnych fazach stacjonarnych. Fazy takie znalazły zastosowanie zarówno w chromatografii gazowej jak również w wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Na przełomie lat 1983/84 dostępne były w handlu jedynie dwie chiralne fazy stacjonarne, stosowane w technice HPLC, mianowicie N-(3,5-dinitrobenzoilo)fenyloglicyna oraz fazy oparte na układzie strukturalnym  $\beta$ -cyklodekstryny. Obecnie dostępnych jest ponad 50 różnych typów chiralnych faz stacjonarnych, (tab. 2) [12, 106, 124].

**Tabela 2. Przykładowe chiralne fazy stacjonarne stosowane w technice HPLC.**

Typ oddziaływań międzycząsteczkowych	Typ fazy ruchomej	Środowisko chiralne
Wiązania wodorowe, oddziaływania $\pi$ - $\pi$	Układ faz normalnych	N-(3,5-dinitrobenzoilo)fenyloglicyna, N-(2-naftylo)walina, NEC- $\beta$ -cyklodekstryna, N-(3,5-dinitrobenzoilo)tyrozyna.
Kompleksy inkluzyjne	Układ faz odwróconych	Naturalne cyklodekstryny, upochodnione cyklodekstryny, chiralne etery koronowe.
Wymiana ligantów	Roztwory buforowe z dodatkiem soli miedzi $\text{Cu}^{2+}$	Prolina, hydroksyprolina, histydyna.
Wiązania białkowe	Roztwory buforowe	Albumina surowicy wołowej i ludzkiej.
Polimery naturalne	Układ faz normalnych	Upochodniona celuloza, upochodnione polisacharydy.
Polimery syntetyczne	Układ faz normalnych	Upochodnione polimetakrylany.

Pirkle podzielił chiralne fazy stacjonarne na fazy naturalne i ich pochodne oraz fazy syntetyczne [40, 100].

Wainer jako kryterium podziału przyjął rodzaj kompleksowego połączenia pomiędzy analizowaną substancją a chiralną fazą stacjonarną i na tej podstawie wyróżnił 5 typów faz:

- fazy typu I - tworzą połączenia za pomocą wiązań wodorowych, oddziaływań  $\pi$ - $\pi$  oraz dipol-dipol. Należą tutaj fazy typu Pirkle'a, np. N-(3,5-dinitrobenzoilo)amidowe pochodne (R)-fenyloglicyny (DNB-Phe) oraz N-(3,5-dinitrobenzoilowe) pochodne (R,R) lub (S,S) (-)-1,2-diaminocykloheksanu [34, 127].

- fazy typu II – należą tutaj estrowe pochodne celulozy: trioctany, tribenzoesy, trifenylokarbaminiany. Szczególnie dobry rozdział enancjomerów alprenololu, atenololu, metoprololu, oksprenololu, propranololu, pindololu, tymololu, penbutololu, celiprololu, karazololu oraz bewantololu uzyskano na kolumnie zbudowanej z tris-3,5-dimetylo-fenylo-karbaminianu celulozy, która dostępna jest w handlu pod nazwą Chiralcel OD [2, 3, 4, 5, 6, 25] oraz Chiralcel OD-R [7, 132]. Do tego typu należą również kolumny chiralne, których budowa opiera się na strukturze mocznika, np. kolumna Sumichiral OA, wykorzystywana m. in. do rozdziału enancjomerów albuterolu [8].

- fazy typu III - posiadają chiralne wnęki, dzięki którym tworzą się połączenia inkluzyjne. Zalicza się tutaj mikrokrystaliczną triacetylocelulozę, tribenzoilocelulozę, poliakryloamidy immobilizowane na żelu krzemionkowym, dostępne w handlu pod nazwą Chiraspher (polimer etylo-N-akroilofenyloalaniny) [123]. Szerokie zastosowanie w rozdziale enancjomerów leków  $\beta$ -adrenolitycznych znalazły również cyklodekstryny. Kolumny wypełnione  $\alpha$ -,  $\beta$ - lub  $\gamma$ -cyklodekstryną (CDs) wykorzystano do rozdziału enancjomerów propranololu i metoprololu [41, 60]. Do grupy tej zalicza się również fazy zbudowane z polimetakrylanu trifenylo-metylowego, występujące pod nazwą Chiralpak oraz fazy z chiralnym eterem koronowym, znane pod nazwą Crownpak [50]. Do chiralnych selektorów intensywnie obecnie badanych zalicza się również antybiotyki makrocykliczne [126].

- fazy typu IV - zawierają chiralny ligant (CLEC), najczęściej aminokwas posiadający wbudowany atom metalu, którym jest najczęściej miedź, osadzony na stałym nośniku, tworzący chelatowe, kompleksowe połączenia z enancjomerami na zasadzie wymiany ligantów. Fazy tego typu wprowadzone do powszechnego

zastosowania to: Chiral-Pro, Chiral-Val, Chiral-Hypro, Chiralpak WH, Chiralpak WM oraz Chiralpak WE [50].

- fazy typu V - są fazami białkowymi, tworzącymi kompleksy z migrującymi w fazie ruchomej cząsteczkami rozdzielanej substancji poprzez oddziaływania polarne i hydrofobowe [39].

Pierwszą dostępną w handlu białkową, chiralną fazą stacjonarną opartą na kwaśnej  $\alpha_1$ -glikoproteinie była kolumna LKB Enantiopak. Na kolumnie tej rozdzielano liczne leki, w tym  $\beta$ -adrenolityki, takie jak: alprenolol, oksprenolol, metoprolol, pindolol, propranolol, sotalol [54].

Inna dostępna w handlu kolumna to Chiral-AGP stosowana m.in. do rozdzielenia enancjomerów wielu leków  $\beta$ -adrenolitycznych, np. propranololu oraz metoprololu [11, 22, 38, 47]. Do przygotowania omawianych faz stosuje się zarówno albuminę surowicy ludzkiej (HSA) oraz wołowej (BSA) [95], ponadto owomukoid [52] oraz awidynę znane jako Ultron-OVM [53, 96].

#### ***1.4. Kryteria walidacji metod analitycznych w HPLC***

Walidacja metod analitycznych oparta jest na serii eksperymentalnych procedur celem ustalenia: selektywności, czułości, powtarzalności, odtwarzalności, liniowości kalibracji, wykrywalności oraz oznaczalności metody [14, 19, 30, 71].

***1.4.1. Specyficzność*** jest pojęciem oznaczającym odpowiednio zdolność do jednoznacznego określenia badanego związku w obecności substancji endogennych zawartych w matrycy biologicznej.

***1.4.2. Selektywność*** oznacza zdolność oddzielenia związku od produktów rozkładu, metabolitów i innych leków podawanych równocześnie z oznaczaną substancją.

W poprawnym rozdziale chromatograficznym oznaczane substancje nie interferują zarówno ze związkami endogennymi zawartymi w matrycy biologicznej, jak również produktami rozkładu, metabolitami i innymi lekami.

**1.4.3. Liniowość** określa proporcjonalną zależność pomiędzy znaną ilością analizowanego związku a odpowiedzią detektora.

**1.4.4. Krzywa wzorcowa** określa liniową zależność pomiędzy wartością mierzoną a stężeniem związku. Nachylenie krzywej wzorcowej powinno różnić się statystycznie od zera, punkt przecięcia z osią y nie powinien różnić się statystycznie od zera, współczynnik regresji nie powinien różnić się statystycznie od 1.

**1.4.5. Dolna granica wykrywalności (poziom detekcji, LOD)** jest to najmniejsza ilość badanego związku w próbce, której sygnał można odróżnić od szumów pochodzących z aparatu. Przyjmuje się, że jest to taka ilość związku, która daje sygnał pomiarowy co najmniej dwukrotnie większy od poziomu szumów aparatu.

**1.4.6. Dolna granica oznaczalności (LOQ)** jest to najmniejsze stężenie związku na krzywej wzorcowej, dla której jest podana określona precyzja i dokładność, wyznaczona w jednym dniu i w różnych dniach, przy współczynniku zmienności dla niskich i wysokich wartości stężeń nie przekraczającym odpowiednio 20 % i 10 %. Przyjmuje się, że wartość LOQ powinna być co najmniej dwukrotnie większa od wartości LOD.

**1.4.7. Błąd oznaczania (błąd bezwzględny)** jest różnicą pomiędzy wartością otrzymaną (średnią arytmetyczną wyników) a wartością rzeczywistą. Stosunek wartości błędu bezwzględnego do wartości rzeczywistej określa się jako błąd względny, który zwykle wyrażany jest w procentach i określany jest wówczas jako błąd procentowy.

**1.4.8. Dokładność**, jej miarą jest wielkość błędu względnego, im mniejszy jest błąd, tym większa jest dokładność metody analitycznej.

**1.4.9. Precyzja** jest to zgodność otrzymanych wyników między sobą, wyrażana przez współczynnik zmienności CV, liczony jako stosunek odchylenia standardowego do średniej arytmetycznej.

**1.4.10. Odzysk** jest to porównanie odpowiedzi detektora pochodzącej od związku badanego z odpowiedzią uzyskaną od tego samego związku, poddanego wcześniej procesowi ekstrakcji z matrycy biologicznej.

**1.4.11. Powtarzalność** jest to zgodność wyników uzyskanych jedną metodą, z zastosowaniem tej samej aparatury, podczas wielokrotnego analizowania identycznych próbek, w krótkich odstępach czasu, przez jednego analityka, pracującego w jednym laboratorium (analiza w jednym dniu).

**1.4.12. Odtwarzalność** jest to zgodność wyników uzyskanych podczas analizowania jedną metodą identycznych próbek, lecz przez różnych analityków, pracujących w różnych laboratoriach lub w tym samym laboratorium lecz w dużych odstępach czasu (analiza w różnych dniach).

## **1.5. Kryteria rozdziału chromatograficznego**

**Współczynnik pojemnościowy (  $k$  )**, wskazuje na właściwe usytuowanie pików oznaczanych substancji pomiędzy pikami matrycy biologicznej, przyjmuje się, że jego wartość powinna być większa od 2. Współczynnik ten oblicza się z następującego równania [13, 122]:

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

w równaniu tym poszczególne symbole oznaczają:

$t_r$  - czas retencji oznaczanego związku,

$t_o$  - czas retencji rozpuszczalnika.

**Współczynnik rozdzielania (  $\alpha$  )**, wskazuje na właściwe usytuowanie obok siebie dwóch pików pochodzących od oznaczanych substancji, wyrażany jest jako stosunek współczynników pojemnościowych poszczególnych związków, liczony jest z następującego równania [27, 117]:



$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

w którym poszczególne symbole oznaczają:

$k_1$  – współczynnik pojemnościowy związku wymywanego w pierwszej kolejności,

$k_2$  – współczynnik pojemnościowy związku wymywanego w drugiej kolejności.

*Zdolność rozdzielcza* ( $R_S$ ) jest miarą stopnia rozdzielenia dwóch umieszczonych obok siebie pików, powinna przyjmować wartości większe od 2, liczona jest z następującego równania [80, 86]:

$$R_S = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2}$$

w którym  $t_{r1}$ ,  $t_{r2}$ , oraz  $w_1$  i  $w_2$  oznaczają odpowiednio czasy retencji związku wymywanego w pierwszej i drugiej kolejności oraz szerokości pików tych związków.

## 2. Cel pracy

Ocena leku w aspekcie jego struktury przestrzennej ma na celu właściwą interpretację profilu farmakodynamicznego, farmakokinetycznego i klinicznego danego leku. Dotyczy to nie tylko nowych leków ale także już stosowanych w praktyce klinicznej w postaci racemicznej.

Możliwość uwzględnienia chiralnej budowy leku w ocenie jego dyspozycji w żywym organizmie, jaka powstała na przestrzeni ostatnich kilku lat, jest wynikiem z jednej strony postępu w syntezie optycznie czynnych izomerów a z drugiej, jak przedstawiono w części teoretycznej, dynamicznego rozwoju odpowiednich metod analitycznych.

$\beta$ -adrenolityki należą do grupy leków, które zgodnie z decyzją FDA z 1992 roku zostały wytypowane do ponownej oceny z punktu widzenia ich chiralnej budowy.

Dotychczas przeprowadzone badania w odniesieniu do acebutololu wykazały enancjoselektywny charakter farmakokinetyki tego leku u ludzi. Jak przedstawiono we wstępie pracy badania te zostały przeprowadzone u zdrowych ochotników [63, 103].

W warunkach klinicznych wiele czynników fizjologicznych, patofizjologicznych oraz środowiskowych (wiek, genotyp, płeć, inne leki) może dodatkowo stanowić przyczynę enancjoselektywnego przebiegu procesów farmakokinetycznych [104].

Tego typu badania mające na celu wykazanie enancjoselektywnego charakteru tych procesów umożliwiają uściślanie zależności pomiędzy stężeniem danego leku a obserwowanym efektem a także są pomocne w wyjaśnianiu międzyosobniczych różnic w efekcie klinicznym obserwowanym po podaniu leku w postaci racemicznej oraz w optymalizacji ich dawkowania.

Warunkiem rzetelnej oceny tych zjawisk jest dysponowanie odpowiednią metodą analityczną, opracowaną zgodnie z kryteriami dobrej praktyki laboratoryjnej.

Dlatego też celem przeprowadzonych badań było w pierwszym etapie opracowanie i porównanie metod oznaczania stężeń AC i DC w postaci racemicznej oraz ich enancjomerów a także walidacja tych metod.

W następnym etapie przeprowadzono analizę kinetyki leku macierzystego oraz jego aktywnego farmakologicznie metabolitu w stanie stacjonarnym u chorych z nadciśnieniem tętniczym, na podstawie wyników analizy stężeń AC i DC oraz ich enancjomerów oznaczanych odpowiednio metodą achiralną oraz chiralną w osoczu krwi, erytrocytach oraz pełnej krwi.

Ponadto oceniono procent wiązania racemicznego acebutololu i diacetololu oraz ich enancjomerów z erytrocytami oraz obliczono ich współczynniki podziału pomiędzy erytrocyty i osocze.

### **3. Część doświadczalna**

#### **3.1. Metodyka badań**

##### **3.1.1. Związki będące przedmiotem badań**

- Chlorowodorek oraz forma zasadowa racemicznego acebutololu (RS-AC), (Rhône-Poulenc, Rorer, Francja),
- Chlorowodorek oraz forma zasadowa racemicznego diacetololu (RS-DC), (Rhône-Poulenc, Rorer, Francja),
- Enancjomery S(-)-AC, R(+)-AC, S(-)-DC oraz R(+)-DC (dar Prof. dr Hassan Y. Aboul-Enein, Bioanalytical and Drug Development Laboratory, Biological and Medical Research Department, King Faisal Specialist Hospital and Research Centre, Riyadh, Arabia Saudyjska).

##### **3.1.2. Standardy wewnętrzne**

- Chlorowodorek HC 36096, (IS), (Rhône-Poulenc, Rorer, Francja),
- Pindolol, (PI), (Sigma, St. Louis, MO, USA),
- Chlorowodorek S-(+)-propranololu, (S(+))PR, (dar Prof. dr Hassan Y. Aboul-Enein).

Wymienione związki stosowano jako standardy wewnętrzne odpowiednio w metodach achiralnej, chiralnej pośredniej oraz chiralnej bezpośredniej.

##### **3.1.3. Odczynniki stosowane w badaniach**

- S(+)-NEIC – (+)-izocyjanian (S)-1-naftyloetylu, (Aldrich, Milwaukee, WI, USA),

- Acetonitryl, metanol, etanol, heksan, chloroform, octan etylu, dietyloamina, trietyloamina, izopropanol, chlorek metylu, wodorotlenek sodu (Merck, Niemcy),
  - 85 % kwas ortofosforowy,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (Fluka, Szwajcaria),
- Wszystkie wymienione odczynniki były czystości HPLC.

### 3.1.4. Roztwory stosowane w badaniach

- Roztwory podstawowe badanych związków: chlorowodorki racemicznego AC oraz DC w metanolu, formy zasadowe racemicznego AC i DC w 0.01 % roztworze trietyloaminy w chloroformie lub w 0.01 % roztworze dietyloaminy w heksanie, formy zasadowe enancjomerów AC w 0.01 % roztworze dietyloaminy w heksanie, wszystkie o stężeniu 1 mg/mL.
- Roztwory podstawowe standardów wewnętrznych: chlorowodorku HC36906 w metanolu, chlorowodorku R-(+)-propranololu w etanolu, formy zasadowej pindololu w metanolu, również o stężeniu 1 mg/mL.

Poszczególne roztwory podstawowe rozcieńczano odpowiednio metanolem lub etanolem, celem otrzymania roztworów roboczych o żądanych stężeniach i przechowywano w lodówce w temperaturze + 4°C.

Ponadto stosowano:

- 10 % roztwór podstawowy S(+)-NEIC w chloroformie przechowywano w temperaturze - 20°C, roztwór roboczy 0.2 % S(+)-NEIC przygotowywano każdego dnia przez rozcieńczanie chloroformem roztworu podstawowego,
- 0.01 % roztwór trietyloaminy w chloroformie,
- 0.01 % roztwór dietyloaminy w heksanie,
- 0.14 molowy, 0.1 molowy oraz 2 molowy roztwór wodorotlenku sodu,
- 0.1 oraz 1/15 molowy roztwór  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
- 1/15 molowy roztwór  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,
- 0.1 molowy roztwór kwasu solnego,
- roztwór PBS o składzie: 0.14 mol  $\text{NaCl}$ , 0.1 mol buforu fosforanowego o pH = 7.4 (1/15 mol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 1/15 mol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  w stosunku 2:8).

### 3.1.5. Aparatura

Do pomiaru stężenia badanych związków wykorzystano technikę HPLC, stosując aparat do wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej firmy Thermo Separation Products (San Jose, CA, USA), składający się z następujących elementów:

- pompa izokratyczna o zakresie przepływu fazy ruchomej od 0.01 do 10 ml/min (SP 8800/8810/IsoChrom LC Pump),
- detektor UV-VIS ze zmienną długością fali (Spectra 100),
- detektor spektrofluorymetryczny (SpectraSystem FL 3000),
- dozownik z pętlą o pojemności 50  $\mu$ L (typ 7125, Rheodyne, USA),
- integrator (SP 4400 Chrom Jet).

Ponadto stosowano:

- wytrząsarke termostatowaną (Elpan, typ 357),
- medyczną łaźnię wodną (typ LW 102),
- wortex (typ WL-I),
- wirówkę (Hettich, typ EBA 12R).

Rozdział chromatograficzny badanych związków przeprowadzano stosując następujące kolumny:

- kolumnę Supelcosil LC-8-DB, 25 cm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m wraz z przedkolumną Supelguard, 2 cm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m, (Supelco, Bellefonte, PA, USA) – stosowane do rozdziału racemicznego AC i DC metodą achiralną,
- kolumnę Supelcosil LC-Si, 25 cm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m wraz z przedkolumną Supelguard LC-Si, 2 cm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m, (Supelco, Bellefonte, PA, USA) stosowane do rozdziału enancjomerów AC i DC metodą pośrednią,
- kolumnę chiralną Chiralpak AD, 25 cm  $\times$  0.46 cm I.D., 5  $\mu$ m wraz z przedkolumną Chiralpak AD, 5 cm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m, (Daicel Chemical Industries, Tokio, Japonia) - stosowane do rozdziału enancjomerów AC i DC metodą bezpośrednią.

### 3.1.6. Materiał biologiczny

- Pełna krew stosowana w analizie pobierana była od zdrowych ochotników z Punktu Krwiodawstwa CM UJ do 3.8 % roztworu cytrynianu sodu.
- Pełna krew pacjentów leczonych acebutololem w I Klinice Kardiologii CM UJ, pobierana była również do 3.8 % roztworu cytrynianu sodu.
- Osocze i erytrocyty otrzymywano po odwirowaniu pełnej krwi, pochodzącej zarówno od zdrowych ochotników, jak również chorych leczonych acebutololem.
- Erytrocyty ( RBC ) przemyte izotonicznym roztworem PBS.

### 3.2. *Metodyka ekstrakcji badanych związków z materiału biologicznego*

Ekstrakcję oznaczanych związków prowadzono wzorując się na pracy Guentert i współpr. [51]. W tym celu do 0.9 mL osocza, pełnej krwi lub przemytych erytrocytów dodawano 100  $\mu$ L oznaczanych związków (AC i DC), 100  $\mu$ L odpowiedniego standardu wewnętrznego o stałym stężeniu, 1 mL wody redestylowanej oraz 100  $\mu$ L 2 molowego roztworu NaOH. Próbki dokładnie mieszano przez kilka sekund, następnie dodawano 5 mL odczynnika ekstrahującego, jakim był octan etylu i wytrząsano przez 2 min na vorteksie, po czym odwirowywano przez 20 minut przy szybkości obrotów rotora 3000 r.p.m. Następnie 4 mL warstwy organicznej przenoszono ilościowo do szklanej probówki stożkowej i odparowywano do sucha w temperaturze 37°C na łaźni wodnej w atmosferze azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano w 100  $\mu$ L fazy ruchomej i po dokładnym wymieszaniu na vorteksie przez 2 minuty, 50  $\mu$ L roztworu nanoszono na odpowiednią kolumnę chromatograficzną.

### ***3.3. Metody analityczne***

W przeprowadzonych badaniach opracowano i stosowano do oznaczania w materiale biologicznym stężeń racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów następujące techniki HPLC:

- achiralną z detekcją UV-VIS,
- chiralną pośrednią z detekcją UV-VIS,
- chiralną bezpośrednią z detekcją UV-VIS lub spektrofluorymetryczną.

Opracowanie warunków analizy z zastosowaniem wymienionych powyżej metod analitycznych dotyczyło: wyboru analitycznej długości fali, doboru składu i szybkości przepływu fazy ruchomej oraz ustalenia liniowości odpowiedzi stosowanego detektora.

#### **3.3.1. Oznaczanie stężeń racemicznego AC i DC metodą achiralną**

Wybór analitycznej długości fali obejmował analizę widm metanolowych roztworów AC i DC w zakresie długości fal od 200 do 260 nm

Modyfikacja składu fazy ruchomej zawierającej wodę, acetonitryl i bufor fosforanowy o pH=3.3 dotyczyła optymalnego ustalenia ilości acetonitrylu oraz kwasowości fazy [51].

Liniowość odpowiedzi stosowanego detektora UV-VIS badano w zakresie ilości AC i DC od 25 do 1000 ng. W tym celu z roztworów podstawowych chlorowodorków AC i DC o stężeniu 1 mg/mL przygotowywano przez rozcieńczenie metanolem roztwory robocze o podanym powyżej zakresie ilości związku. Następnie na odpowiednią kolumnę nanoszono po 50  $\mu$ L każdego z roboczych roztworów, mierząc pola powierzchni otrzymanych pików. Badano zależność pól powierzchni pików od ilości AC i DC nanoszonych na kolumnę.

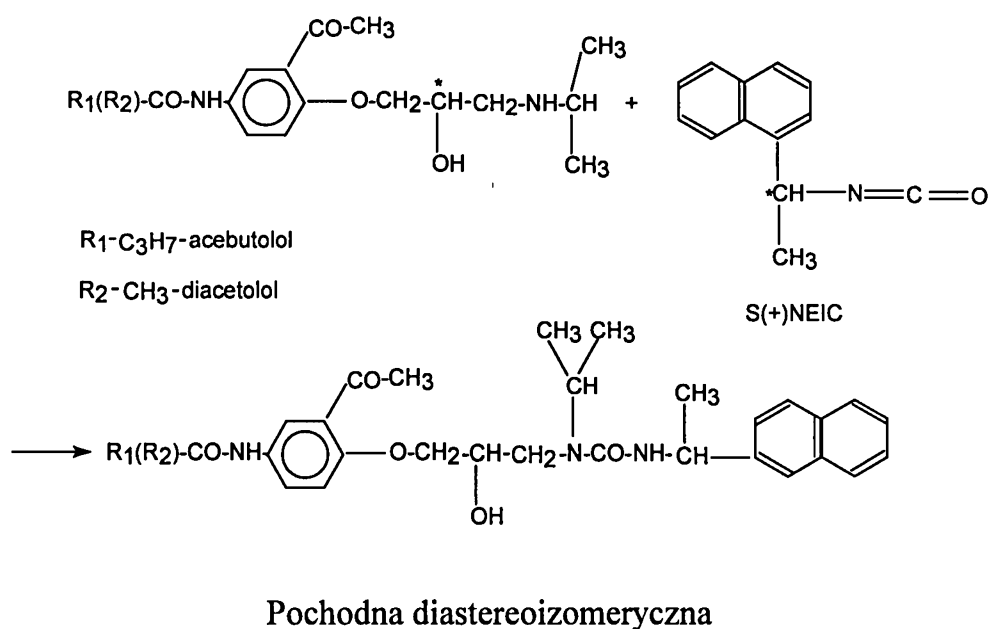


### 3.3.2. Oznaczanie stężeń enancjomerów AC i DC metodą pośrednią

Skład fazy ruchomej będącej mieszaniną heksanu, chloroformu i metanolu ustalono na podstawie pracy autorów Piquette-Miller M. i wsp. [101, 102].

Liniowość odpowiedzi stosowanego detektora badano dla zakresu ilości enancjomerów AC i DC od 25 do 500 ng po uprzednim ich upochodnieniu 0.2 % roztworem S(+)-NEIC. W tym celu odparowywano do sucha po 100  $\mu$ L roboczych roztworów formy zasadowej AC i DC w 0.01 % roztworze trietyloaminy w chloroformie. Następnie do otrzymanej suchej pozostałości dodawano po 100  $\mu$ L roztworu S(+)-NEIC, dokładnie mieszano przez 2 minuty na vorteksie, inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, po czym 50  $\mu$ L roztworu nanoszono na odpowiednią kolumnę. Badano zależność pól powierzchni pików enancjomerów AC i DC od ilości nanoszonych na kolumnę związków.

Na rycinie 3 przedstawiono schemat reakcji upochodnienia acebutololu i diacetololu z zastosowaniem S(+)-NEIC.



Rycina 3. Schemat reakcji upochodnienia acebutololu oraz diacetololu.

### **3.3.3. Oznaczanie stężeń enancjomerów AC i DC metodą bezpośrednią, z zastosowaniem detekcji UV-VIS**

Skład fazy ruchomej ustalano na podstawie podanej przez producenta instrukcji użytkowania kolumny chiralnej, stosując mieszaninę heksanu i etanolu o różnym składzie objętościowym z dodatkiem dietyloaminy. Optymalną szybkość przepływu fazy ruchomej poszukiwano w zakresie od 0.8 do 1.5 mL/min.

Liniowość odpowiedzi stosowanego detektora oceniano dla zakresu ilości enancjomerów AC i DC od 10 do 500 ng. W tym celu z roztworów podstawowych badanych związków o stężeniu 1 mg/mL w 0.01 % roztworze dietyloaminy w heksanie przygotowywano przez rozcieńczanie ich roztwory robocze o podanym powyżej zakresie. Następnie na kolumnę chiralną наносono po 50  $\mu$ L każdego z tych roztworów, mierząc pola powierzchni pików. Badano zależność pól powierzchni pików enancjomerów AC i DC od ilości związków наносzonych na kolumnę.

### **3.3.4. Oznaczanie stężeń enancjomerów AC i DC metodą bezpośrednią, z zastosowaniem detekcji spektrofluorymetrycznej**

W celu określenia optymalnych wartości długości fali wzbudzenia oraz emisji dla enancjomerów AC i DC zmieniano długość fali wzbudzenia w zakresie od 230 nm do 330 nm oraz długość fali emisji od 330 do 450 nm.

Liniowość odpowiedzi stosowanego detektora badano dla zakresu ilości enancjomerów AC i DC od 5 do 500 ng. W tym celu z roztworów podstawowych badanych związków o stężeniu 1 mg/mL w 0.01% roztworze dietyloaminy w heksanie przygotowywano przez rozcieńczanie ich roztwory robocze o podanym zakresie. Następnie nastrzykiwano na kolumnę chiralną po 50  $\mu$ L każdego z tych roztworów mierząc pola powierzchni pików. Badano zależność pól powierzchni pików enancjomerów AC i DC od ilości związków наносzonych na kolumnę.

### ***3.4. Analiza stężeń stacjonarnych racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów w osoczu i pełnej krwi chorych***

Opracowane metody analityczne zastosowano do oznaczania stężeń racemicznego AC i DC a także enancjomerów tych związków w osoczu i pełnej krwi pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, leczonych acebutololem (Sectral, Rhône-Poulenc, Rorer, Francja) i hospitalizowanych w I Klinice Kardiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (Kierownik: prof. dr hab. med. Kalina Kawecka-Jaszcz). Chorzy pozostawali pod bezpośrednią opieką dr med. Bogumiły Bacior oraz lek. med. Janusza Kochmana. Protokół badań został zatwierdzony przez Komisję Etyczną CM UJ a każdy chory wyraził pisemną zgodę na prowadzenie badań.

#### **3.4.1. Pacjenci**

Badaniami objęto ogółem 38 chorych, wśród których można wyróżnić dwie grupy:

- I grupa obejmowała 24 chorych, (13 mężczyzn i 11 kobiet, w wieku od 19 do 64 lat, średnia wieku wynosiła  $44.4 \pm 14.9$ ), u których oznaczano stężenia stacjonarne racemicznego AC i DC w osoczu i pełnej krwi stosując metodę achiralną. Próbkę krwi pobierano po różnych czasach od podania ostatniej dawki leku ( 0, 1, 2, 4, 8 h).
- II grupa obejmowała 14 chorych, (5 mężczyzn i 9 kobiet, w wieku od 33 do 61 lat, średnia wieku wynosiła  $46.5 \pm 8.5$ ), u 5 chorych tej grupy stężenia stacjonarne enancjomerów AC i DC w osoczu i pełnej krwi oznaczano stosując każdą z opracowanych metod, tzn. metodę pośrednią oraz bezpośrednią z detekcją UV-VIS lub spektrofluorymetryczną. Próbkę krwi pobierano przed podaniem kolejnej dawki leku oraz po 1, 2, 4, 8 h od jej podania.

Wszyscy chorzy otrzymywali acebutolol w postaci tabletek  $\hat{a}$  200 mg, w różnych dawkach, podawanych raz lub dwa razy na dobę. Ponadto niektórym chorym podawano inne leki wspomagające (tab. 3).

U wszystkich pacjentów wykonywano podstawowe badania analityczne, takie jak: morfologia krwi, stężenia: białka całkowitego, albuminy, bilirubiny, glukozy, mocznika, kwasu moczowego, kreatyniny, elektrolitów, aminotransferazy asparaginianowej (AspAt), aminotransferazy alaninowej (AlAt), fosfatazy alkalicznej.

W trakcie leczenia wykonywano ponadto u tych chorych rutynowe badania elektrokardiograficzne (EKG) oraz pomiar ciśnienia tętniczego krwi metodą Holtera.

**Tabela 3. Charakterystyka badanych chorych.**

Liczba chorych	38
Płeć	20 K i 18 M
Wiek [lata] (średnia±SD)	19-64 (45.2 ± 12.8)
Masa ciała [kg] (średnia±SD)	54-100 (72.9 ± 10.9)
Wzrost [cm] (średnia±SD)	150-184 (168.1 ± 9.60)
Hematokryt (średnia±SD)	28.4-49.1 (39.7 ± 4.34)
Klirens kreatyniny [mL/min ] (średnia±SD)	74.6-122.5 (90.1 ± 11.3)
Inne najczęściej podawane leki: Kaptopryl – 7 chorych	
	Nifedypina – 8 chorych
	Enalapryl – 3 chorych
	Klonidyna – 2 chorych
	Hydrochlorotiazyd – 3 chorych
	Werapamil – 1 chory
	Metoprolol – 1 chory
	Pentaerytrytol – 1 chory

### 3.5. Obliczenia farmakokinetyczne

Na podstawie stężeń stacjonarnych racemicznego AC i DC oraz enancjomerów tych związków oznaczanych odpowiednio w osoczu i pełnej krwi

chorych obliczano parametry farmakokinetyczne, takie jak: pole pod krzywą stężenie – czas (AUC), stała szybkości eliminacji ( $K_e$ ), biologiczny okres półtrwania ( $t_{0.5}$ ), stężenie maksymalne ( $C_{max}$ ) oraz czas po którym osiągnane jest to stężenie ( $t_{max}$ ), stosując program WinNonlin, przy założeniu modelu jednokompartamentowego. Ocenę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzano z zastosowaniem dwuczynnikowej analizy wariancji w układzie kompletnie zrandomizowanym.

Ocenę statystyczną porównania opracowanych metod analitycznych przeprowadzano jednoczynnikową analizą wariancji w układzie hierarchicznym.

We wszystkich badaniach statystycznych przyjęto poziom istotności równy 0.05.

### ***3.6. Badanie wiązania racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów z erytrocytami***

#### **3.6.1. Metodyka badań w warunkach in vivo**

Analizę stężeń racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów w osoczu i pełnej krwi chorych uzupełniono badaniem wiązania tych związków z erytrocytami. Procent wiązania leku obliczano korzystając z równania (1) [84].

$$f = 1 - \frac{C_p}{C_b}(1 - Ht) \quad (1)$$

Poszczególne symbole w tym równaniu oznaczają:

f - procent wiązania leku [%],

$C_p$  - stężenie leku w osoczu [ng/mL],

$C_b$  - stężenie leku w pełnej krwi [ng/mL],

Ht - hematokryt.

### 3.6.2. Metodyka badań w warunkach in vitro

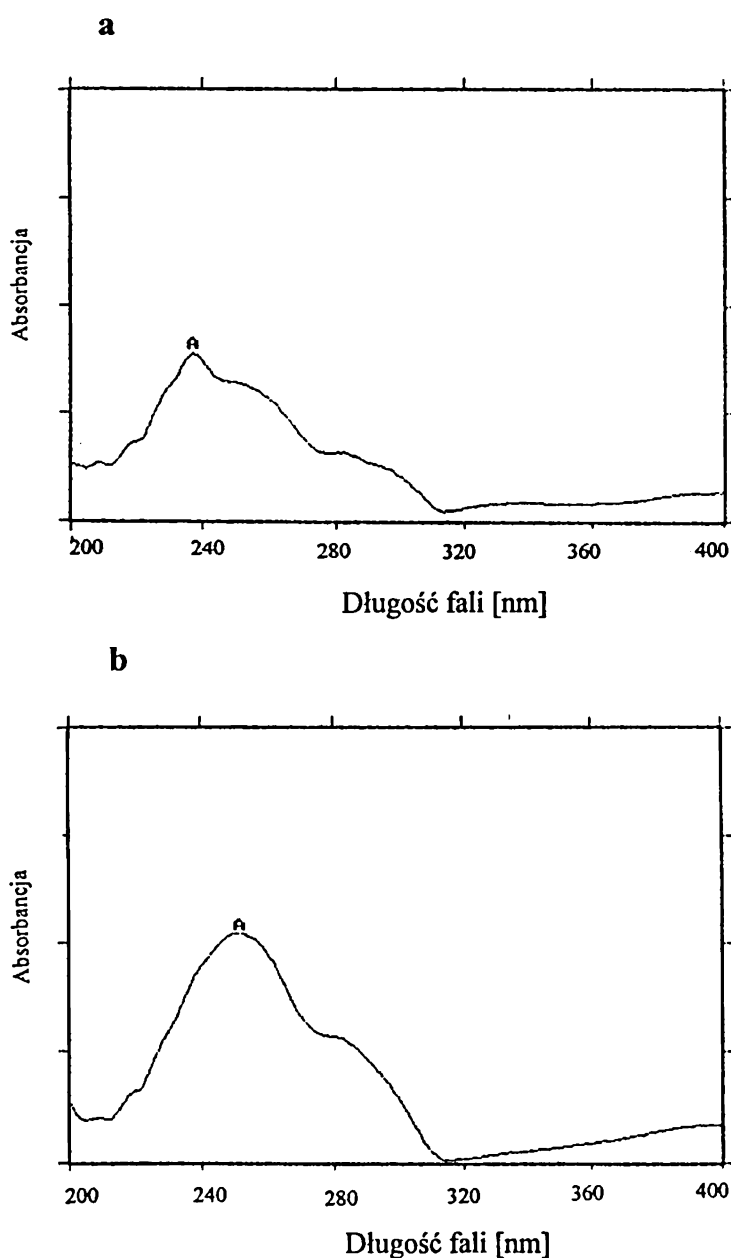
Do badań wiązania leku z erytrocytami w warunkach in vitro wykorzystano krew pełną pobieraną od zdrowych ochotników do 3.8 % roztworu cytrynianu sodu. Następnie do objętości 0.9 mL krwi dodawano po 100  $\mu$ L roztworu racemicznego AC i DC o znanym stężeniu, mieszczącym się w zakresie od 50 do 1000 ng/mL. Badane próbki inkubowano przez 1 h w temperaturze 37 °C, wytrząsając na łaźni wodnej, następnie pobierano 0.3 mL pełnej krwi, a resztę wirowano przez 20 minut z szybkością obrotów rotora 3000 r.p.m., rozdzielając na frakcję osocza i erytrocytów. Stężenia racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów oznaczano zarówno w pełnej krwi, osoczu, jak i erytrocytach, stosując odpowiednio metodę achiralną z detekcją UV-VIS oraz chiralną bezpośrednią z detekcją spektrofluorymetryczną. Procent wiązania racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów obliczano podobnie jak w warunkach in vivo z równania (1).

## 4. Wyniki

### 4.1. Warunki analizy oraz walidacja achiralnej metody oznaczania racemicznego AC i DC.

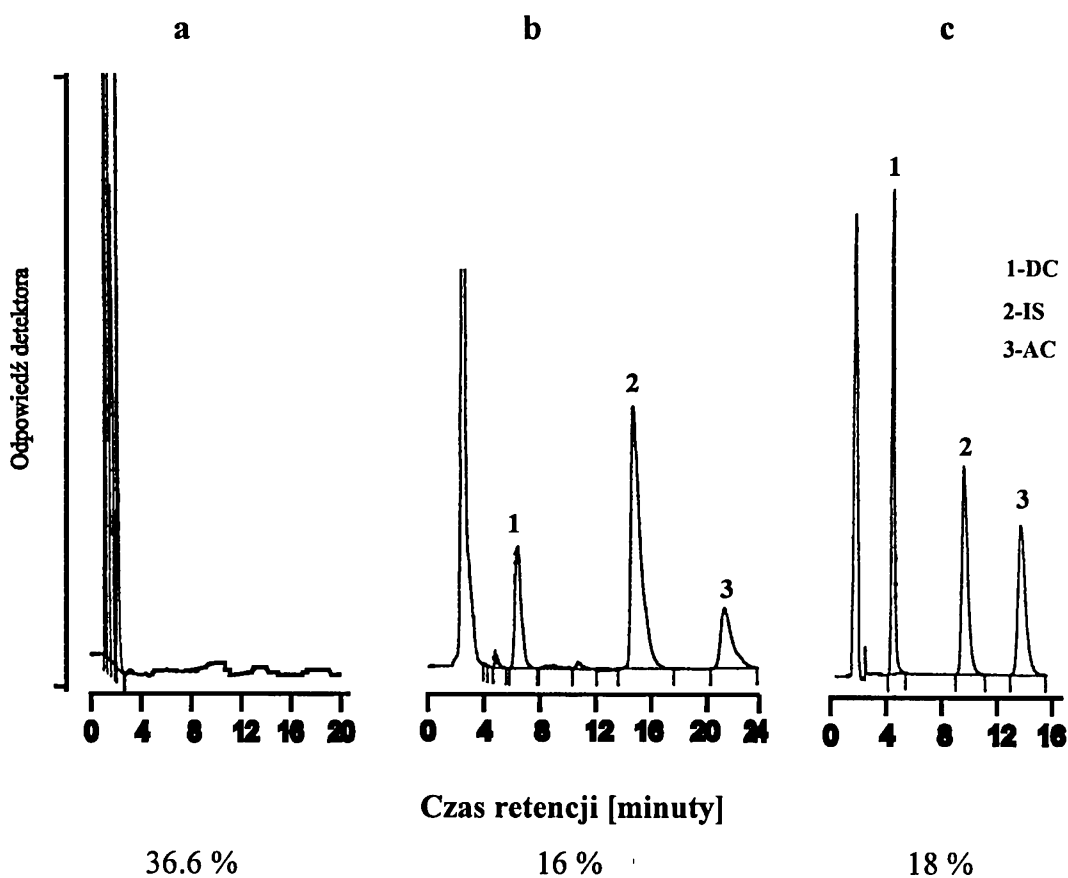
#### 4.1.1. Warunki analizy

Z analizy widm metanolowych roztworów racemicznego AC i DC wynika, że analityczna długość fali dla badanych związków wynosiła 240 nm (ryc. 4).



Rycina 4. Widma absorpcyjne dla acebutololu (a) i diacetololu (b).

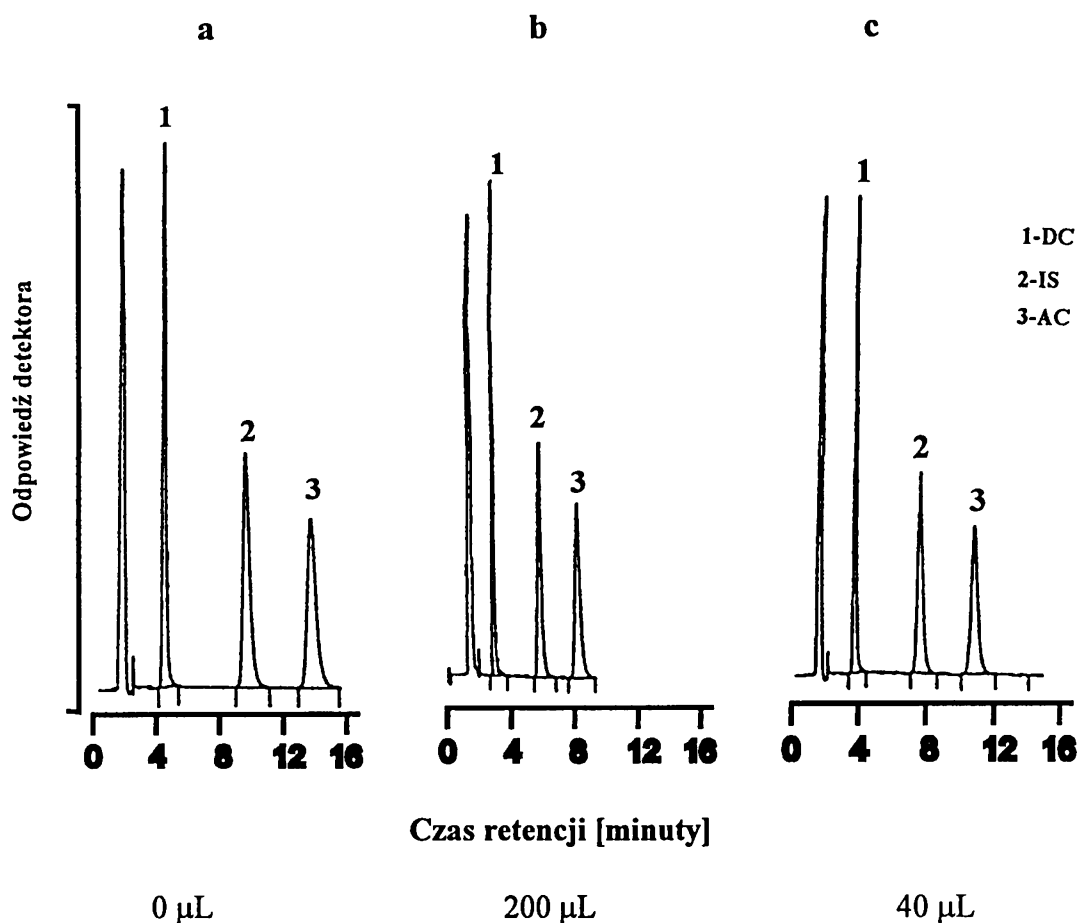
Zawartość acetonitrylu w fazie ruchomej wahała się od 16 % do 36.6 %. Duża zawartość procentowa tego składnika powodowała niepełny rozdział badanych związków oraz znaczne skrócenie ich czasów retencji (ryc. 5a). Zmniejszenie natomiast zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej wydłużało czas analizy i prowadziło do efektu ogonowania pików (ryc. 5b). Pełny i zadawalający rozdział badanych związków uzyskano przy zawartości acetonitrylu równej 18 % (ryc. 5c).



*Rycina 5. Wpływ ilości acetonitrylu w fazie ruchomej na rozdział AC, DC oraz IS (HC 36096).*

Na rozdział badanych związków miało wpływ również pH fazy ruchomej. Dodatek kwasu ortofosforowego wpływał na ostrość i symetrię pików oraz znaczne skrócenie czasu analizy (ryc. 6).

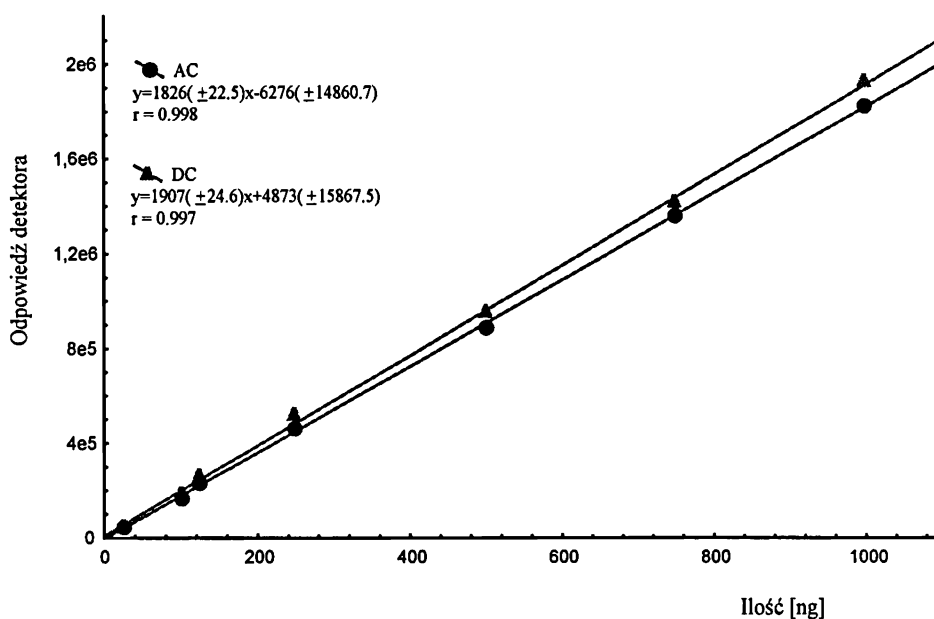




*Rycina 6. Wpływ ilości kwasu ortofosforowego w fazie ruchomej na rozdział AC, DC oraz IS (HC 36096).*

Optymalną fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu, wody i 0.1 M buforu fosforanowego o pH=3.3, zmieszanych w stosunku 18:79:3 v/v z dodatkiem 40 µL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> na 1L fazy (ryc. 6c).

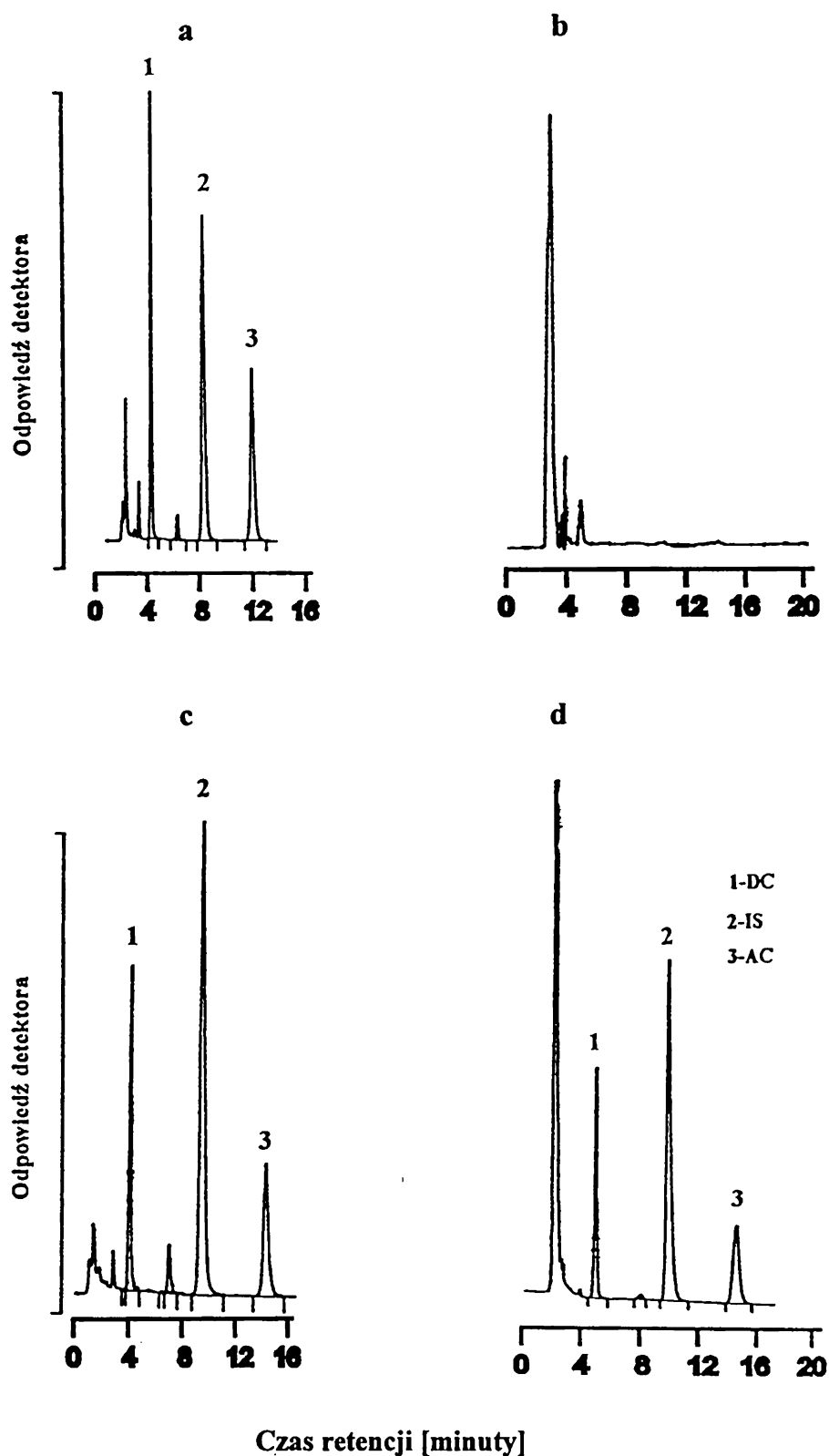
Badanie liniowości odpowiedzi detektora wykazało, że zależność pól powierzchni pików od ilości racemicznych AC i DC nanoszonych na kolumnę była liniowa w badanym zakresie od 25 do 1000 ng. Współczynniki korelacji dla tych zależności były równe 0.998 oraz 0.997 odpowiednio dla AC i DC (ryc. 7).



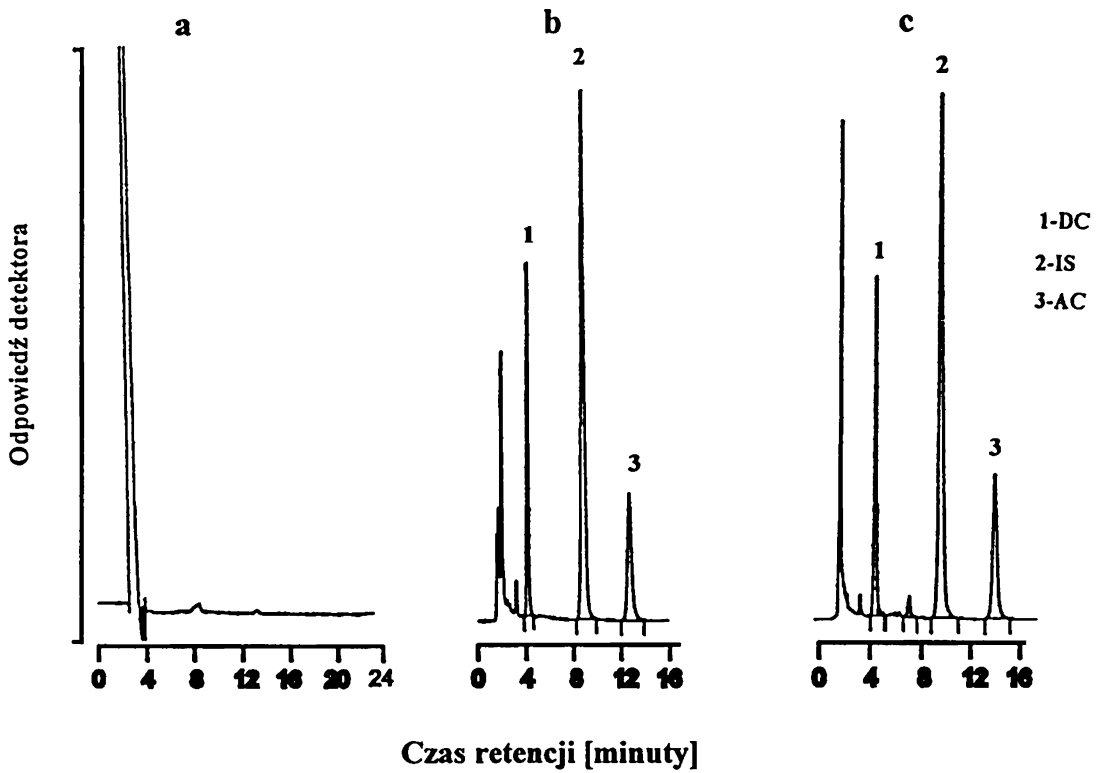
*Rycina 7. Zależność odpowiedzi detektora UV-VIS od ilości nanoszonych na kolumnę racemicznych AC i DC.*

#### 4.1.2. Walidacja metody

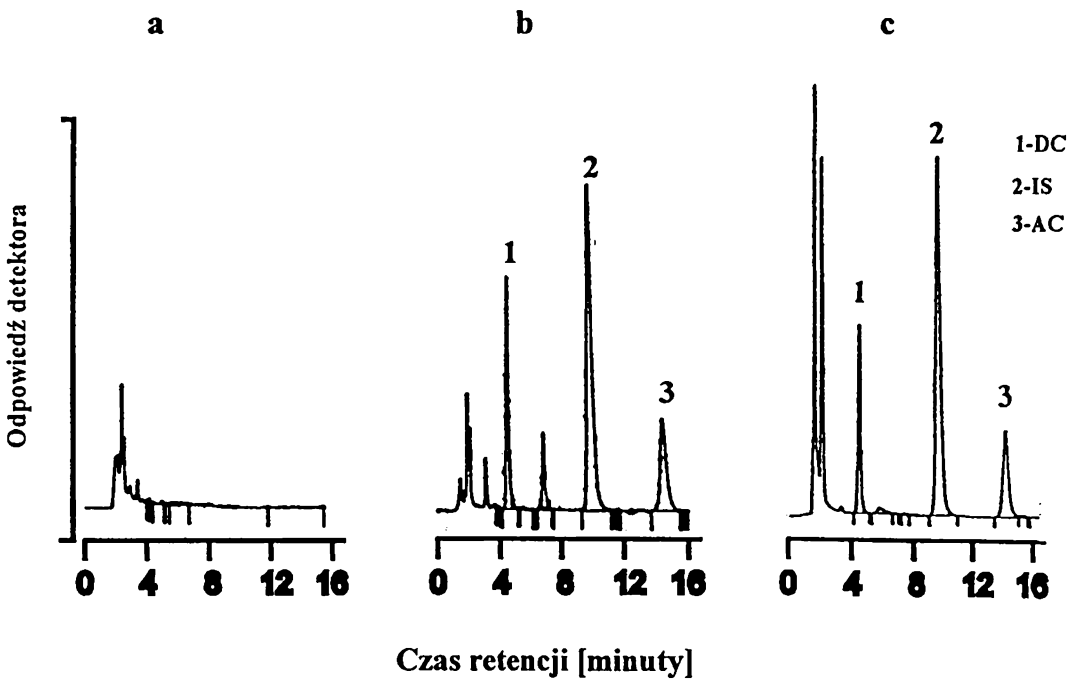
Opracowane warunki analizy chromatograficznej pozwoliły na uzyskanie pełnego i zadawalającego rozdzielania badanych związków (ryc. 8a). Nie stwierdzono interferencji AC i DC, jak również IS zarówno z substancjami endogennymi zawartymi w matrycy biologicznej (ryc. 8b i 8c, 9a i 9b oraz 10a i 10b), jak również produktami rozkładu, metabolitami i innymi lekami podawanymi równocześnie z oznaczanymi związkami (ryc. 8d, 9c i 10c).



*Rycina 8. Przykładowe chromatogramy: próbki wzorcowej zawierającej racemiczny AC i DC o stężeniu 250 ng/mL oraz IS o stężeniu 2000 ng/mL (a), osocza kontrolnego (bez leku) (b), osocza zawierającego racemiczny AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz IS o stężeniu 2000 ng/mL (c), osocza pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (d).*



*Rycina 9. Przykładowe chromatogramy: próbek pełnej krwi kontrolnej (bez leku) (a), pełnej krwi zawierającej AC i DC o stężeniu 250 ng/mL (b), pełnej krwi pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (c).*



*Rycina 10. Przykładowe chromatogramy: próbek erytrocytów (bez leku) (a), erytrocytów zawierającej AC i DC o stężeniu 250 ng/mL (b), erytrocytów pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (c).*

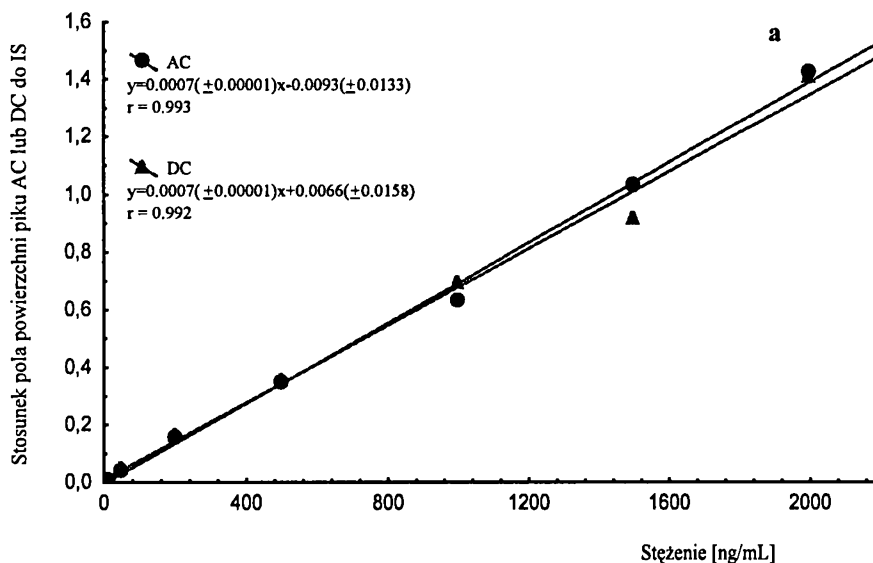
Omówione w części teoretycznej parametry rozdziału racemicznego AC i DC z zastosowaniem metody achiralnej, jak wynika z tabeli 4 były optymalne, świadczy to, że jakość rozdziału chromatograficznego w podanych warunkach analizy była zadawalająca.

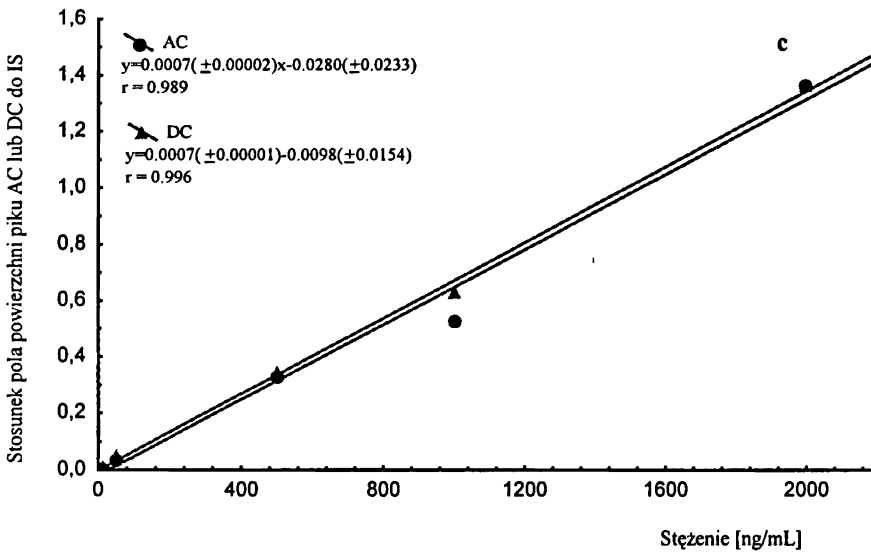
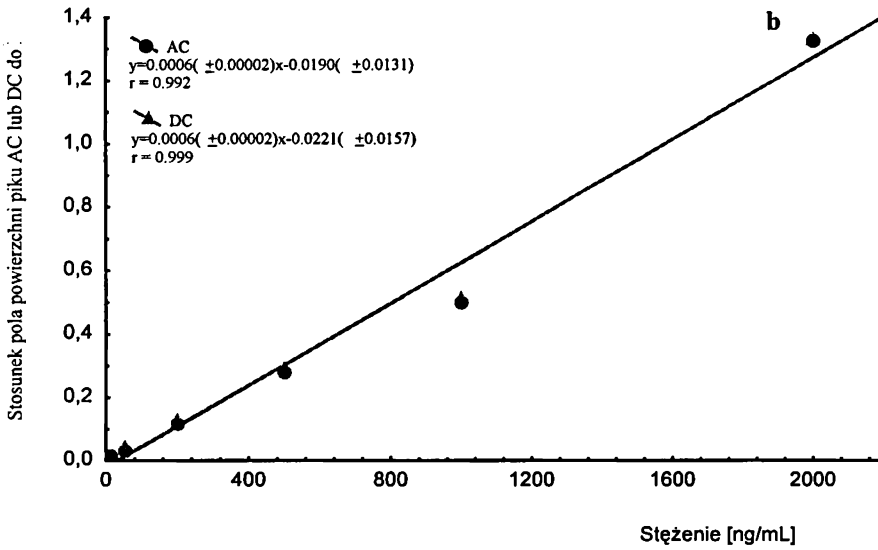
**Tabela 4.** Parametry jakości rozdziału chromatograficznego badanych związków, w osoczu, pełnej krwi i erytrocytach.

Związek	Parametry*					
	Osocze		Krew		RBC	
	AC	DC	AC	DC	AC	DC
k	11.8	2.2	12.3	2.7	11.7	2.5
$\alpha$	5.4		4.6		4.3	
$R_s$	22.3		21.9		22.1	

\* wyznaczone parametry stanowią średnią z 6 pomiarów.

Z zależności przedstawionych na rycinie 11 dla wszystkich analizowanych związków, oznaczanych odpowiednio w osoczu, pełnej krwi oraz erytrocytach, wynika, że krzywe wzorcowe były liniowe w zakresie stężeń AC i DC od 10 do 2000 ng/mL. Współczynniki korelacji dla tych zależności wahały się od 0.989 do 0.999.





*Rycina 11. Krzywe wzorcowe racemicznego AC i DC wyznaczone dla: osocza (a), pełnej krwi (b), erytrocytów (c).*

Dolna granica wykrywalności (LOD) dla racemicznego AC i DC wynosiła 5 ng/mL, przy stosunku sygnału do poziomu szumów aparatu równym 4:1.

Dolna granica oznaczalności (LOQ) wyznaczona dla badanych związków w osoczu, pełnej krwi oraz erytrocytach wahała się od  $8.89 \pm 0.2$  ng/mL do  $10.4 \pm 0.9$  ng/mL, zarówno dla AC jak i DC, przy współczynniku zmienności niższym od 10 % i wartości błędu względnego nie przekraczającego 15% (tab. 5).

**Tabela 5.** Wartości stężeń dolnej granicy wykrywalności oraz dolnej granicy oznaczalności dla racemicznego AC i DC w osoczu, pełnej krwi oraz erytrocytach, ( $n=6$ ).

Związek	LOD [ng/mL]	Osocze			Krew			RBC		
		LOQ $\pm$ SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	LOQ $\pm$ SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	LOQ $\pm$ SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]
AC	5	$9.78 \pm 0.9$	9.61	- 2.20	$8.89 \pm 0.2$	1.82	-11.1	$10.4 \pm 0.9$	9.12	+ 4.20
DC	5	$9.69 \pm 0.5$	4.96	- 3.10	$9.73 \pm 0.8$	8.13	-2.70	$9.46 \pm 0.1$	1.28	- 5.40

W tabeli 6 przedstawiono wyniki badań precyzji i dokładności opracowanej metody dla oznaczeń AC i DC wykonanych w osoczu krwi, odpowiednio w jednym dniu i w różnych dniach. Analogiczne wyniki badań dla oznaczeń wykonanych w pełnej krwi oraz erytrocytach zebrano w tabelach 7 i 8.

**Tabela 6. Precyzja i dokładność metody oznaczania racemicznego AC i DC w osoczu, (n=6).**

Związek	Stężenie [ng/mL]	W jednym dniu			W różnych dniach		
		Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]
AC	10	9.37 ± 0.9	9.36	- 6.30	9.78 ± 0.9	9.61	- 2.20
	500	489.15 ± 8.9	1.83	- 2.17	499.34 ± 26.4	5.29	- 0.13
	2000	2049.02 ± 64.3	3.14	+2.45	2048.93 ± 59.8	2.92	+2.45
DC	10	9.45 ± 0.3	3.22	- 5.50	9.69 ± 0.5	4.96	- 3.10
	500	487.14 ± 19.5	4.0	- 2.57	492.25 ± 18.9	3.84	- 1.55
	2000	2023.58 ± 56.9	2.81	+1.18	2081.77 ± 83.5	4.01	+4.09

**Tabela 7. Precyzja i dokładność metody oznaczania racemicznego AC i DC w pełnej krwi, (n=5).**

Związek	Stężenie [ng/mL]	W jednym dniu			W różnych dniach		
		Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]
AC	10	8.84 ± 0.2	2.24	- 11.6	8.89 ± 0.2	1.82	- 11.1
	500	484.35 ± 8.5	1.76	- 3.13	466.45 ± 26.6	5.69	- 6.71
	2000	2064.73 ± 8.9	0.43	+3.24	2090.02 ± 36.9	1.76	+4.50
DC	10	9.34 ± 0.6	6.36	- 6.60	9.73 ± 0.8	8.13	- 2.70
	500	458.89 ± 21.7	4.72	- 8.22	486.19 ± 40.9	8.40	- 2.76
	2000	2075.19 ± 17.1	0.83	+3.76	2101.25 ± 37.8	1.80	+5.06

**Tabela 8. Precyzja i dokładność metody oznaczania racemicznego AC i DC w erytrocytach, (n=5).**

Związek	Stężenie [ng/mL]	W jednym dniu			W różnych dniach		
		Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]
AC	10	10.97 ± 0.1	1.03	+9.70	10.42 ± 0.9	9.12	+4.20
	500	522.04 ± 6.0	1.16	+4.41	539.36 ± 20.7	3.84	+7.87
	2000	2044.92 ± 46.9	2.29	+2.25	2090.49 ± 75.6	3.62	+4.52
DC	10	9.43 ± 0.2	1.57	- 5.70	9.46 ± 0.1	1.28	- 5.40
	500	501.17 ± 15.6	3.11	+0.23	499.67 ± 25.8	5.17	- 0.07
	2000	2088.61 ± 43.6	2.09	+4.43	2161.63 ± 110	5.09	+8.08



Z wartości zestawionych w tabelach 6, 7 i 8 wynika, że opracowana metoda oznaczania racemicznego AC i DC w osoczu, pełnej krwi oraz erytrocytach charakteryzuje się zadawalającą precyzją, (współczynnik zmienności był niższy od 10 %) oraz wymaganą dokładnością, (błąd względny nie przekraczał 15 %).

W tabeli 9 zebrano wyniki badań wydajności procesu ekstrakcji analizowanych związków z osocza krwi. Analogiczne wyniki dla oznaczeń wykonanych w pełnej krwi oraz erytrocytach przedstawiono w tabelach 10 i 11.

**Tabela 9. Wydajność procesu ekstrakcji racemicznego  
AC i DC z osocza, (n=6).**

Odzysk [%] ± SD			
Związek	10 ng/mL	500 ng/mL	2000 ng/mL
AC	84.30±3.51	84.04±4.55	82.60±3.92
DC	86.63±2.53	83.31±6.14	82.82±4.08

**Tabela 10. Wydajność procesu ekstrakcji racemicznego  
AC i DC z pełnej krwi, (n=6).**

Odzysk [%] ± SD			
Związek	10 ng/mL	500 ng/mL	2000 ng/mL
AC	89.38±3.42	83.33±3.57	81.68±3.94
DC	84.53±3.53	81.44±5.16	81.42±5.07

**Tabela 11. Wydajność procesu ekstrakcji racemicznego  
AC i DC z RBC, (n=6).**

Odzysk [%] ± SD			
Związek	10 ng/mL	500 ng/mL	2000 ng/mL
AC	86.35±2.44	82.31±3.42	80.81±4.93
DC	88.11±3.91	82.24±5.07	80.41±7.08

Jak wynika z wartości przedstawionych w tabelach 9, 10 i 11 opracowaną metodę charakteryzuje wysoka wydajność procesu ekstrakcji racemicznego AC i DC, zarówno z osocza, pełnej krwi, jak również erytrocytów.

Analogiczne badania wydajności procesu ekstrakcji standardu wewnętrznego IS, którym był HC 36096 o stężeniu 2000 ng/ml przeprowadzone z tych matryc biologicznych wykazały, że przyjęta procedura ekstrakcji zapewniała jego odzysk rzędu  $80.63 \% \pm 3.89$  do  $86.02 \pm 6.12$ , przy współczynniku zmienności równym od 4.81 do 8.77 % dla każdej z badanych matryc biologicznych.

## 5.1. Warunki analizy oraz walidacja pośredniej metody oznaczania enancjomerów AC i DC

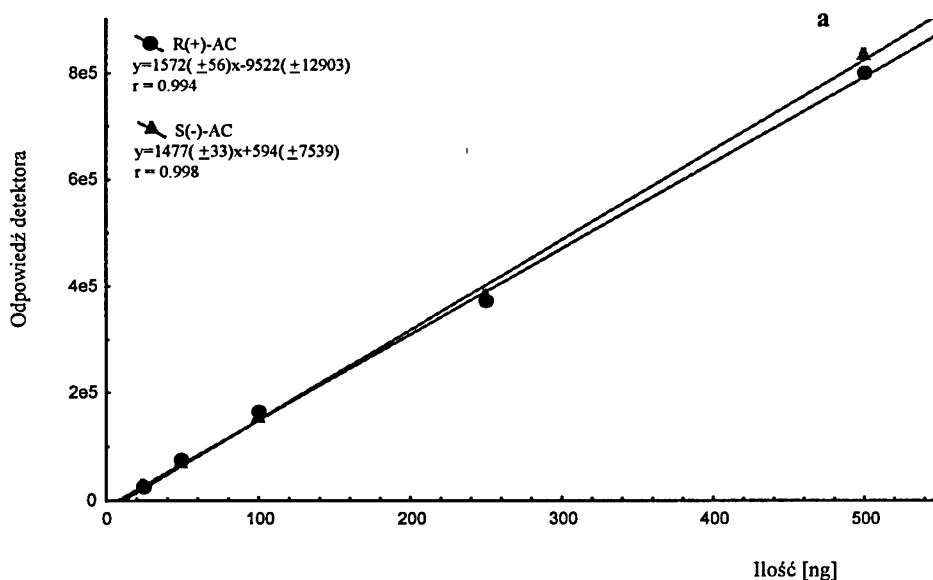
### 5.1.1. Warunki analizy

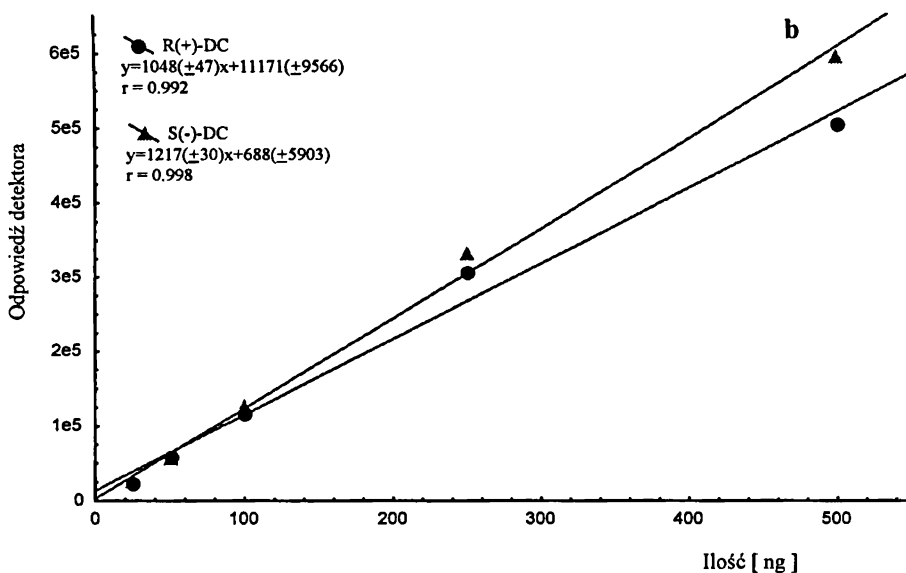
Oznaczanie stężeń enancjomerów AC i DC przeprowadzono przy analitycznej długości fali równej 240 nm.

Fazę ruchomą stanowiła mieszanina heksanu, chloroformu i metanolu w stosunku objętościowym 63:35:2.

Jako standard wewnętrzny zastosowano racemiczny pindolol (PI), do obliczeń wykorzystano drugi z wymywanych pików.

Badanie odpowiedzi detektora UV-VIS wykazało, że zależność pól powierzchni pików od ilości enancjomerów AC i DC nanoszonych na kolumnę była liniowa w badanym zakresie od 25 do 500 ng. Współczynniki korelacji dla tych zależności wahały się od 0.992 do 0.998 (ryc. 12).

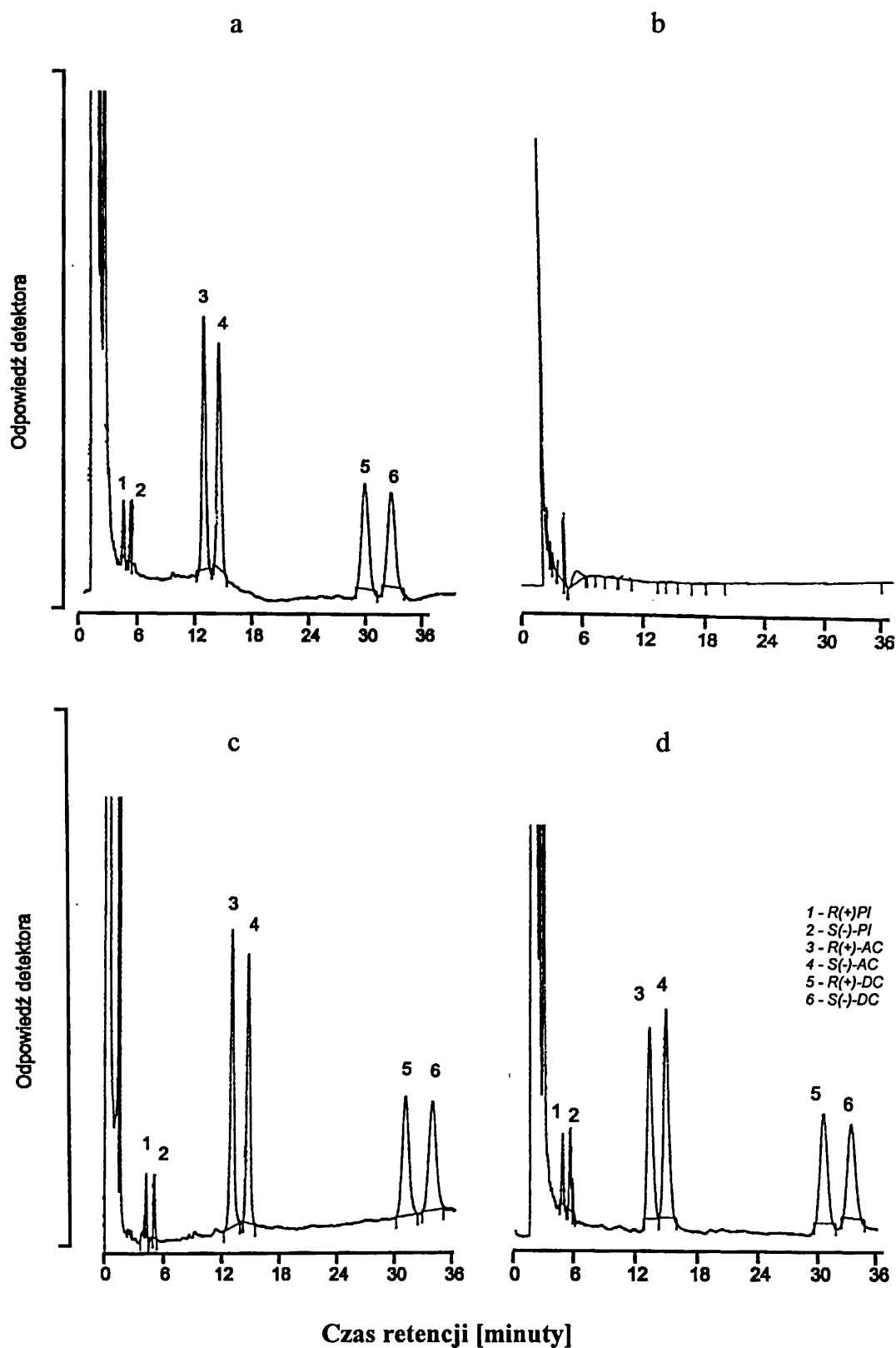




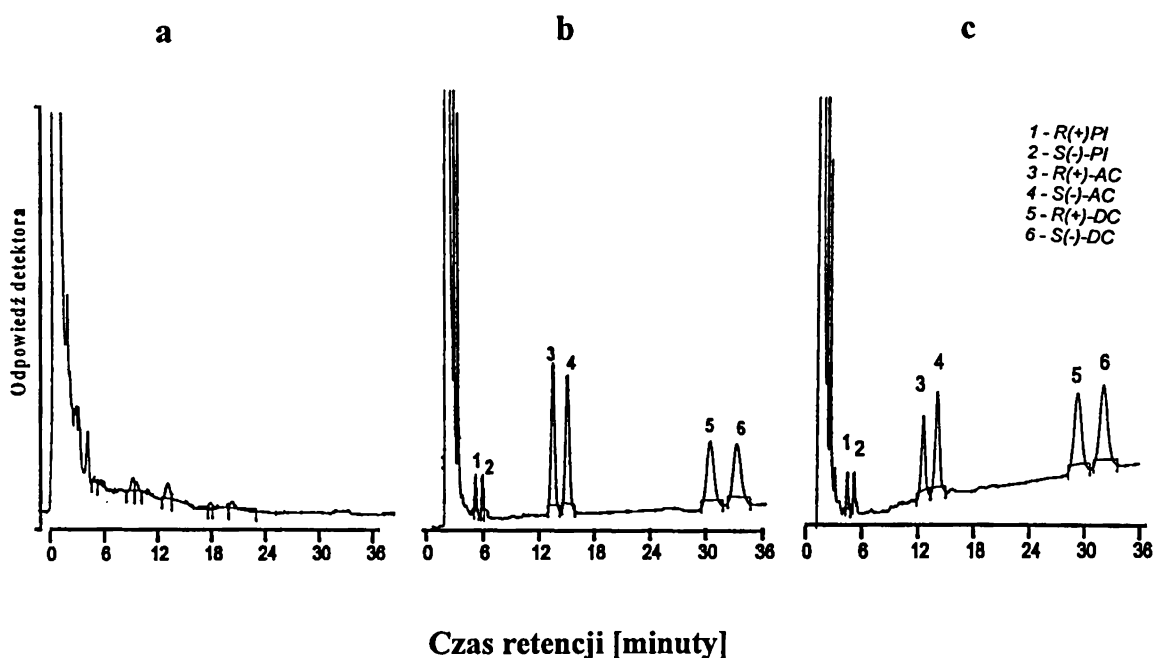
*Rycina 12. Wykresy zależności odpowiedzi detektora UV-VIS od ilości nanoszonych na kolumnę enancjomerów S(-)-AC i R(+)-AC (a) oraz S(-)-DC i R(+)-DC (b).*

### 5.1.2. Walidacja metody

W przeprowadzonych warunkach analizy chromatograficznej metodą pośrednią uzyskano pełny i zadawalający rozdział badanych związków (ryc. 13a). Nie stwierdzono interferencji oznaczanych enancjomerów AC i DC oraz enancjomerów standardu wewnętrznego (pindolol, PI) zarówno z substancjami endogennymi zawartymi w matrycy biologicznej (ryc. 13b i 13c oraz 14a i 14b), jak również produktami rozkładu, metabolitami i innymi lekami podawanymi równocześnie z oznaczanymi związkami (ryc. 13d i 14c).



*Rycina 13. Przykładowe chromatogramy: próbki wzorcowej enancjomerów AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz PI o stężeniu 300 ng/mL (a), osocza kontrolnego (bez leku) (b), osocza zawierającego enancjomery AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz PI o stężeniu 300 ng/mL (c), osocza pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (d), otrzymane metodą pośrednią.*



*Rycina 14. Przykładowe chromatogramy: pełnej krwi kontrolnej (bez leku) (a), pełnej krwi zawierającej enancjomery AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz PI o stężeniu 300 ng/mL (b), pełnej krwi pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (c), otrzymane metodą pośrednią.*

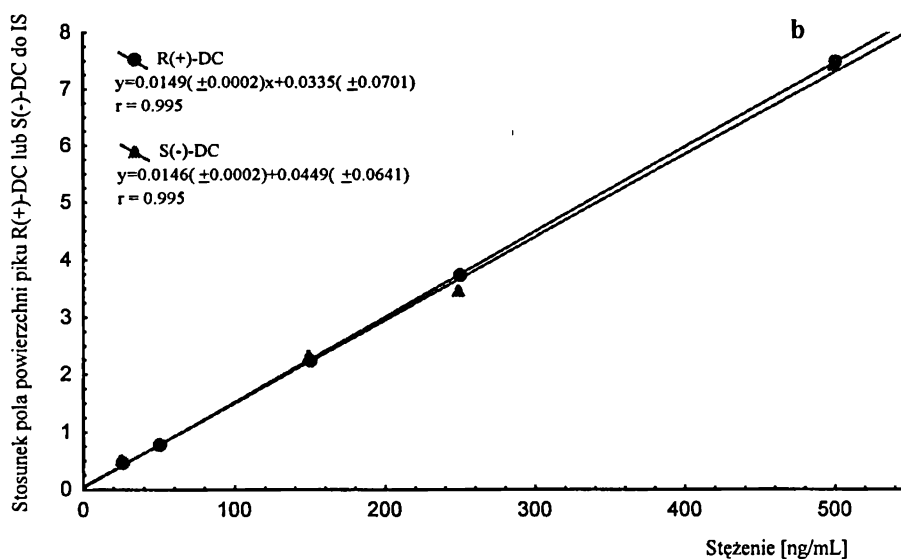
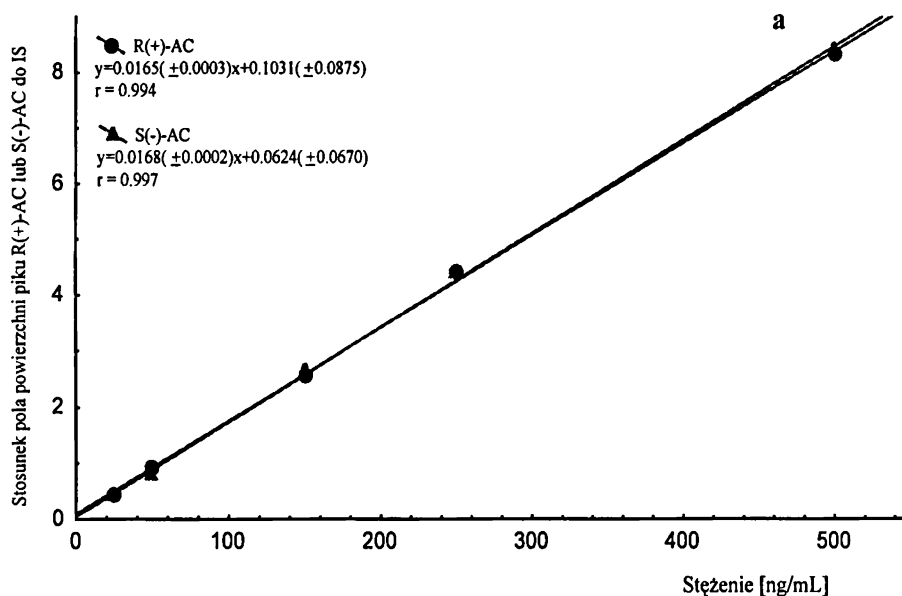
Jak wynika z tabeli 12, jakość rozdzielania chromatograficznego z zastosowaniem pośredniej metody oznaczania enancjomerów AC i DC w opracowanych warunkach analizy była zadawalająca, a obliczone parametry rozdzielania spełniały przyjęte kryteria.

*Tabela 12. Parametry jakości rozdzielania chromatograficznego badanych enancjomerów w osoczu i pełnej krwi.*

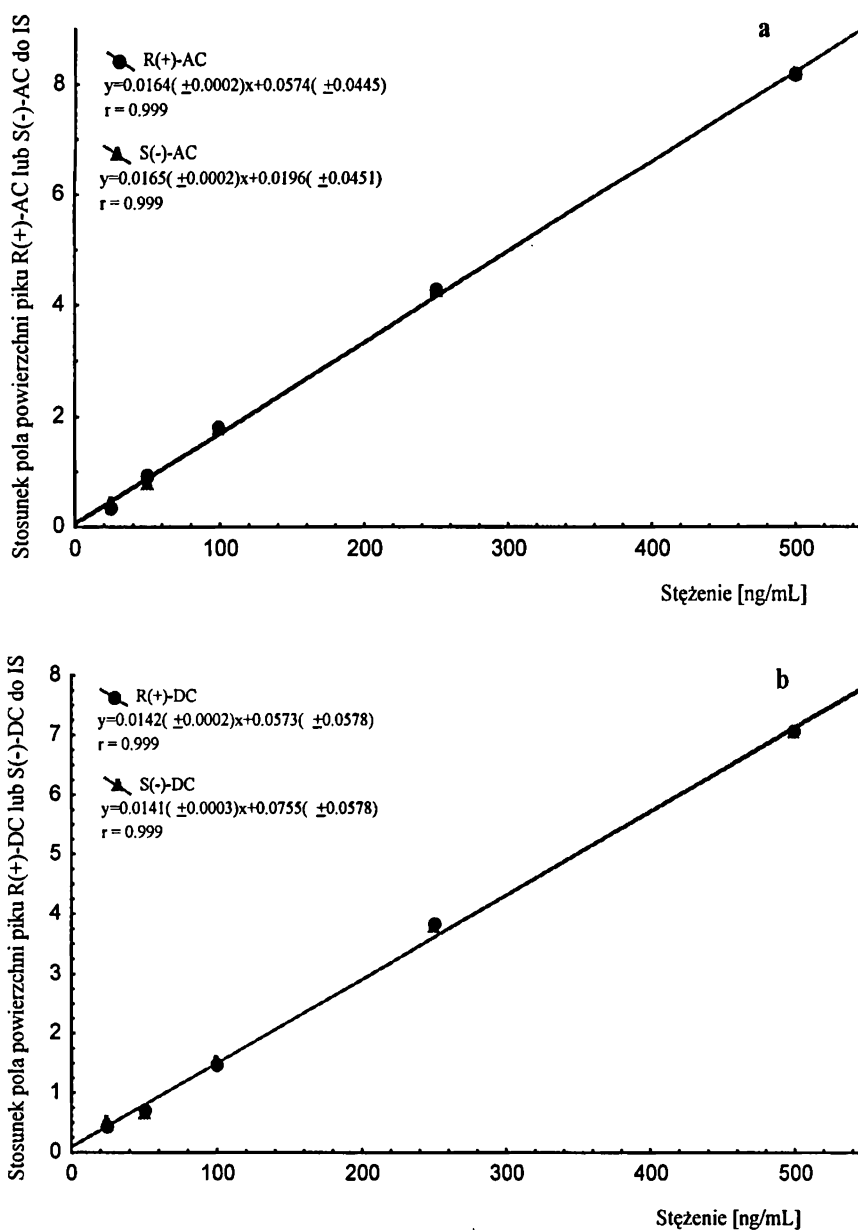
Enancjomery	Parametry*							
	Osocze				Krew			
	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_S$	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_S$
AC	7.0	7.5	1.1	8.1	6.9	7.2	1.2	8.3
DC	1.3	2.1	1.6	8.6	1.5	2.3	1.7	8.5

\* wyznaczone parametry stanowią średnią z 5 pomiarów.

Krzywe wzorcowe enancjomerów AC i DC wyznaczone dla osocza (ryc. 15) oraz dla pełnej krwi (ryc. 16) na podstawie pomiaru ich stężeń metodą pośrednią były liniowe w zakresie badanych stężeń od 25 do 500 ng/mL. Wartości współczynników korelacji dla tych zależności wahały się od 0.994 do 0.997.



**Rycina 15.** Krzywe wzorcowe enancjomerów R(+)-AC i S(-)-AC (a) oraz enancjomerów R(+)-DC i S(-)-DC (b) wyznaczone dla osocza (metoda pośrednia).



*Rycina 16. Krzywe wzorcowe enancjomerów R(+)-AC i S(-)-AC (a) oraz enancjomerów R(+)-DC i S(-)-DC (b) wyznaczone dla pełnej krwi (metoda pośrednia).*

Jako kryterium dolnej granicy wykrywalności (LOD) opracowanej metody pośredniego oznaczania enancjomerów AC i DC przyjęto takie stężenie enancjomeru dla którego stosunek sygnału do poziomu szumów aparatu wynosił 5 : 1. Dla enancjomerów AC odpowiadało ono wartości 5 ng/mL, natomiast dla enancjomerów DC wartości 10 ng/mL.

Dolną granicę oznaczalności (LOQ), odpowiadającą najniższemu stężeniu badanych enancjomerów na krzywej wzorcowej wyznaczono z precyzją, której





miarą jest współczynnik CV nie przekraczający 10 % i błędem względnym niższym od 15 %. Wartość LOQ wahała się pomiędzy  $23.0 \pm 0.66$  ng/mL a  $28.65 \pm 1.80$  ng/mL zarówno dla enancjomerów AC, jak również DC (tab. 13).

**Tabela 13.** Wartości stężeń dolnej granicy wykrywalności oraz dolnej granicy oznaczalności dla enancjomerów AC i DC w osoczu i pełnej krwi.

Związek	LOD [ng/mL]	Osocze			Krew		
		LOQ ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	LOQ ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]
R(+)-AC	5	23.01±2.28	9.92	- 7.9	24.96±0.31	1.23	- 0.16
S(-)-AC	5	23.0 ±0.66	2.86	- 8.0	24.94±2.05	8.20	- 6.02
R(+)-DC	10	28.65±1.80	6.28	+14.6	27.82±0.08	0.28	+11.28
S(-)-DC	10	27.60±1.32	4.79	+10.4	24.76±1.81	7.31	- 0.96

W tabelach 14 i 15 przedstawiono wyniki pomiarów precyzji i dokładności opracowanej metody pośredniego oznaczania enancjomerów AC i DC dla oznaczeń wykonanych w osoczu i pełnej krwi, odpowiednio w jednym dniu i w różnych dniach.

**Tabela 14.** Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w osoczu, odpowiednio w jednym dniu i w różnych dniach, (n=6).

Związek	Stężenie [ng/mL]	W jednym dniu			W różnych dniach		
		Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]
R(+)-AC	25	23.29 ± 1.46	6.25	- 6.84	23.01 ± 2.28	9.92	- 7.96
	250	250.40 ± 11.51	4.60	+0.16	252.15 ± 11.05	4.38	+0.86
	500	470.40 ± 22.63	4.81	- 4.08	490.95 ± 35.55	7.24	- 1.81
S(-)-AC	25	23.05 ± 0.66	2.86	- 8.03	23.0 ± 0.66	2.86	- 8.04
	250	256.23 ± 6.89	2.69	+2.49	260.72 ± 15.89	6.10	+4.29
	500	482.72 ± 10.04	2.07	- 3.46	502.50 ± 22.87	4.55	+0.50
R(+)-DC	25	27.60 ± 2.25	8.15	+10.40	28.65 ± 1.80	6.28	+14.60
	250	232.88 ± 7.99	3.43	- 6.85	251.57 ± 21.95	8.73	+ 0.63
	500	497.54 ± 12.06	2.43	- 0.49	510.31 ± 29.34	5.75	+ 2.06
S(-)-DC	25	27.0 ± 2.19	8.10	+7.96	27.60 ± 1.32	4.79	+10.40
	250	221.67 ± 4.62	2.09	-11.33	228.50 ± 11.29	4.94	- 8.60
	500	486.47 ± 14.48	2.98	- 2.71	494.44 ± 28.90	5.84	- 1.11

**Tabela 15.** Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w pełnej krwi, odpowiednio w jednym dniu i w różnych dniach, (n=6).

Związek	Stężenie [ng/mL]	W jednym dniu			W różnych dniach		
		Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]
R(+)-AC	25	25.41 ± 0.67	2.64	+1.64	24.96 ± 0.31	1.23	- 0.16
	250	256.98 ± 1.04	0.40	+2.79	255.96 ± 2.48	0.97	+2.38
	500	500.80 ± 0.75	0.15	+0.16	496.06 ± 5.95	1.20	- 0.79
S(-)-AC	25	24.97 ± 0.43	1.73	- 0.12	24.94 ± 2.05	8.20	- 6.04
	250	258.03 ± 9.91	3.84	+0.41	254.36 ± 15.10	5.94	+1.74
	500	489.85 ± 9.40	1.92	- 2.03	495.24 ± 1.77	0.36	- 0.95
R(+)-DC	25	27.98 ± 0.30	1.09	+11.92	27.82 ± 0.08	0.28	- 0.52
	250	265.32 ± 2.69	1.02	+ 6.13	265.09 ± 2.38	0.90	+6.04
	500	493.95 ± 2.62	0.53	- 1.21	492.63 ± 0.75	0.15	- 1.47
S(-)-DC	25	23.84 ± 0.50	2.11	- 4.64	24.76 ± 1.81	7.31	- 0.96
	250	260.71 ± 10.90	4.16	+4.28	262.05 ± 8.95	3.42	+4.82
	500	482.56 ± 3.47	0.72	- 3.49	493.50 ± 12.0	2.43	- 1.30

Z wartości zestawionych w tabelach 14 i 15 wynika, że opracowana metoda pośredniego oznaczania enancjomerów AC i DC zarówno w osoczu, jak i w pełnej krwi charakteryzuje się zadawalającą precyzją, współczynnik zmienności był niższy od 10 % oraz wymaganą dokładnością, błąd względny nie przekraczał 15 %.

W tabelach 16 i 17 zebrano wyniki badań wydajności procesu ekstrakcji enancjomerów AC oraz DC odpowiednio z osocza i pełnej krwi.

**Tabela 16.** Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów AC i DC z osocza.

Związek	Odzysk [%] ± SD, (n=6)		
	25 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL
R(+)-AC	79.56 ± 5.45	81.67 ± 5.30	78.70 ± 4.36
S(-)-AC	77.16 ± 2.66	79.89 ± 5.85	79.66 ± 5.04
R(+)-DC	81.45 ± 5.29	81.82 ± 6.44	79.66 ± 5.40
S(-)-DC	82.55 ± 5.42	77.89 ± 4.12	76.17 ± 4.60

**Tabela 17. Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów AC i DC z pełnej krwi.**

Związek	Odzysk [%] ± SD, (n=6)		
	25 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL
R(+)-AC	74.66 ± 4.41	81.57 ± 4.20	88.70 ± 4.21
S(-)-AC	79.16 ± 4.66	89.19 ± 6.85	73.22 ± 4.36
R(+)-DC	91.15 ± 5.44	82.72 ± 7.67	79.86 ± 7.11
S(-)-DC	80.57 ± 4.12	79.01 ± 3.78	86.57 ± 6.22

Dane przedstawione w tabelach 16 i 17 potwierdzają, że opracowaną metodykę charakteryzuje wysoka wydajność procesu ekstrakcji badanych enancjomerów AC i DC, zarówno z osocza, jak również pełnej krwi.

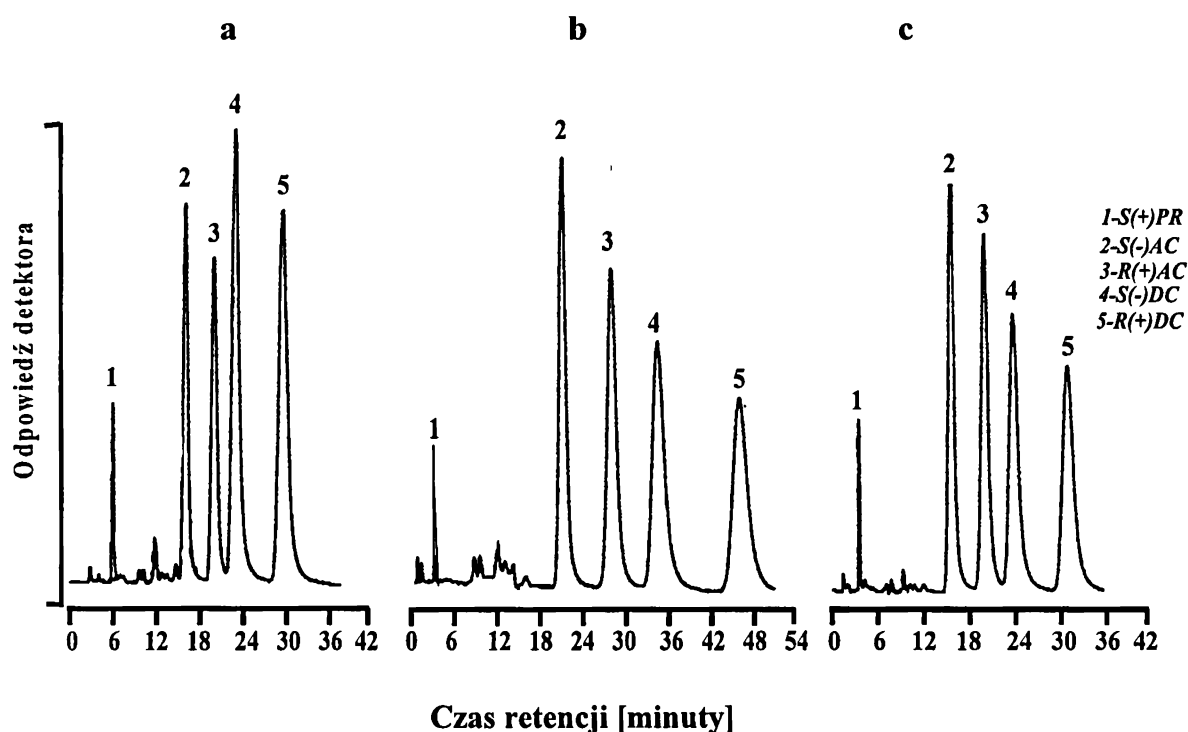
Analogiczne badania wydajności procesu ekstrakcji przeprowadzone z osocza i pełnej krwi dla standardu wewnętrznego, którym był racemiczny pindolol (PI) o stężeniu 300 ng/ml wykazały, że przyjęta procedura zapewniała jego odzysk wynoszący od 79.56 % ± 3.78 do 81.75 ± 8.16, przy współczynniku zmienności równym od 4.75 do 6.24 % z obydwu badanych matryc biologicznych.

## 6.1. Warunki analizy oraz walidacja bezpośredniej metody oznaczania enancjomerów AC i DC z zastosowaniem detekcji UV-VIS

### 6.1.1. Warunki analizy

Oznaczanie stężeń enancjomerów AC i DC przeprowadzono przy analitycznej długości fali równej 240 nm.

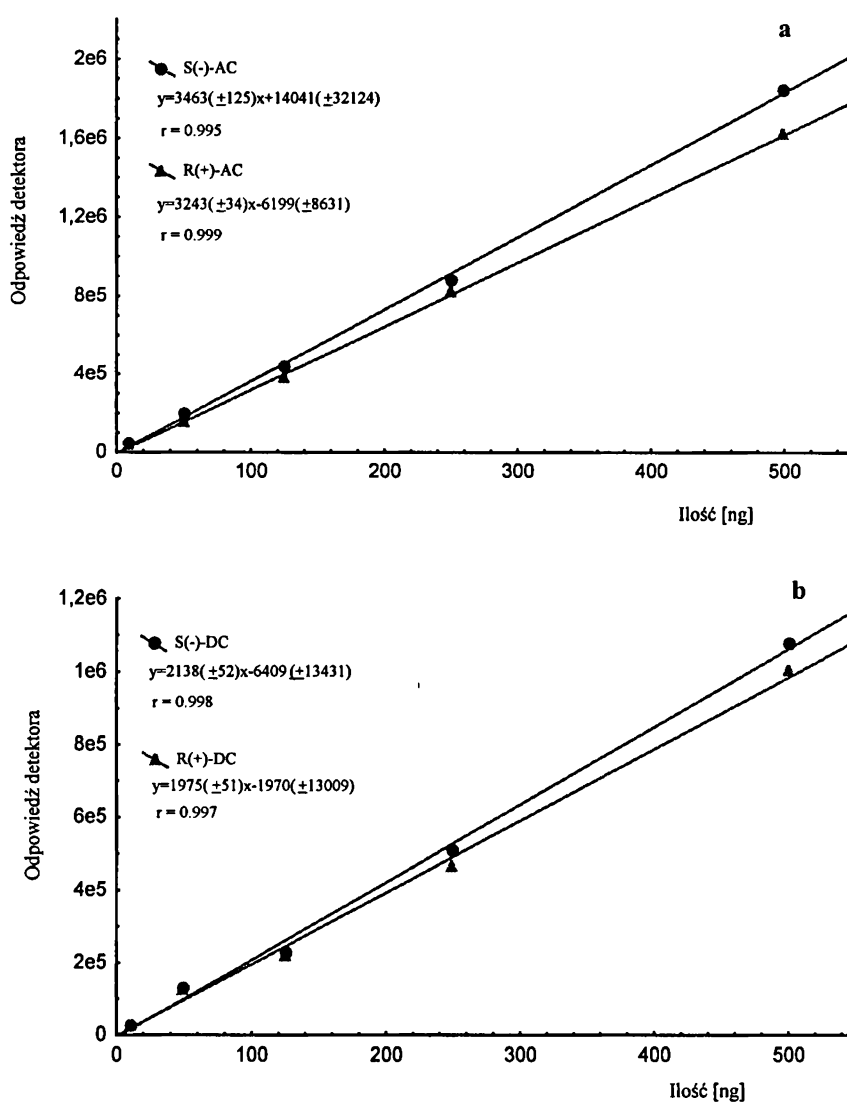
Badania nad ustaleniem składu fazy ruchomej rozpoczęto od roztworu heksanu i etanolu, zmieszanych w stosunku 85 : 15 v/v, przy szybkości przepływu fazy równej 0.8 mL/min. Pomimo stosunkowo krótkiego czasu analizy, trwającego około 30 minut nie uzyskano pełnego i zadawalającego rozdziału badanych enancjomerów (ryc. 17a). Modyfikując fazę ruchomą uzyskano mieszaninę heksanu i etanolu w stosunku 93:7 v/v, przy zwiększonej szybkości przepływu do 1.5 mL/min. W tych warunkach otrzymano pełny rozdział badanych enancjomerów, jednak długi czas analizy, przekraczający 50 minut nie pozwalał na zastosowanie tej fazy w rutynowych badaniach klinicznych (ryc. 17b).



*Rycina 17. Przykładowe chromatogramy przedstawiające wpływ doboru składu i szybkości przepływu fazy ruchomej na rozdział badanych enancjomerów.*

Optymalną fazę stanowiła ostatecznie mieszanina heksanu i etanolu w stosunku 91:9 v/v, z szybkością przepływu równą 1.2 mL/min. Celem „wyostrzenia” otrzymanych pików i nadania im symetrii, do 1 litra fazy ruchomej dodawano ponadto 1 mL dietyloaminy (ryc. 17c).

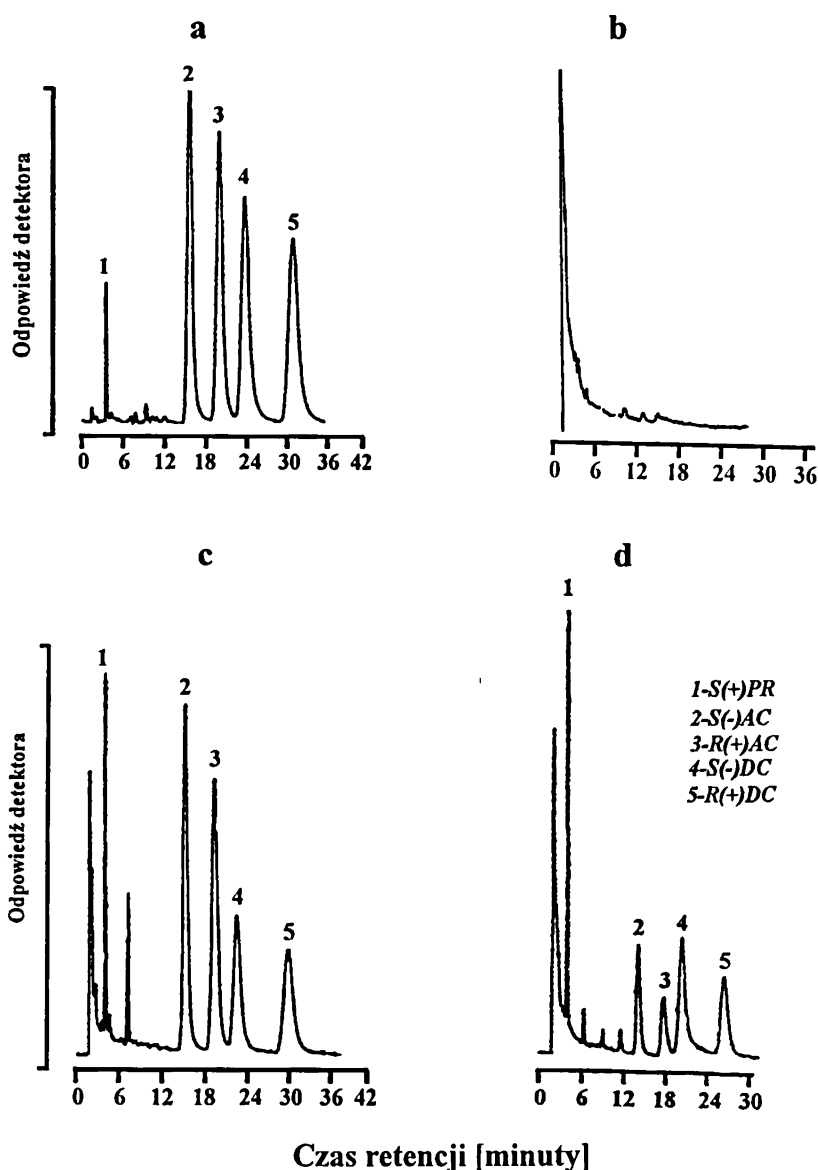
Wykazano liniową zależność pomiędzy polami powierzchni pików a ilością enancjomerów AC i DC nanoszona na kolumnę chiralną w zakresie od 10 do 500 ng. Współczynniki korelacji dla tych zależności mieściły się w zakresie od 0.995 do 0.999 (ryc. 18).



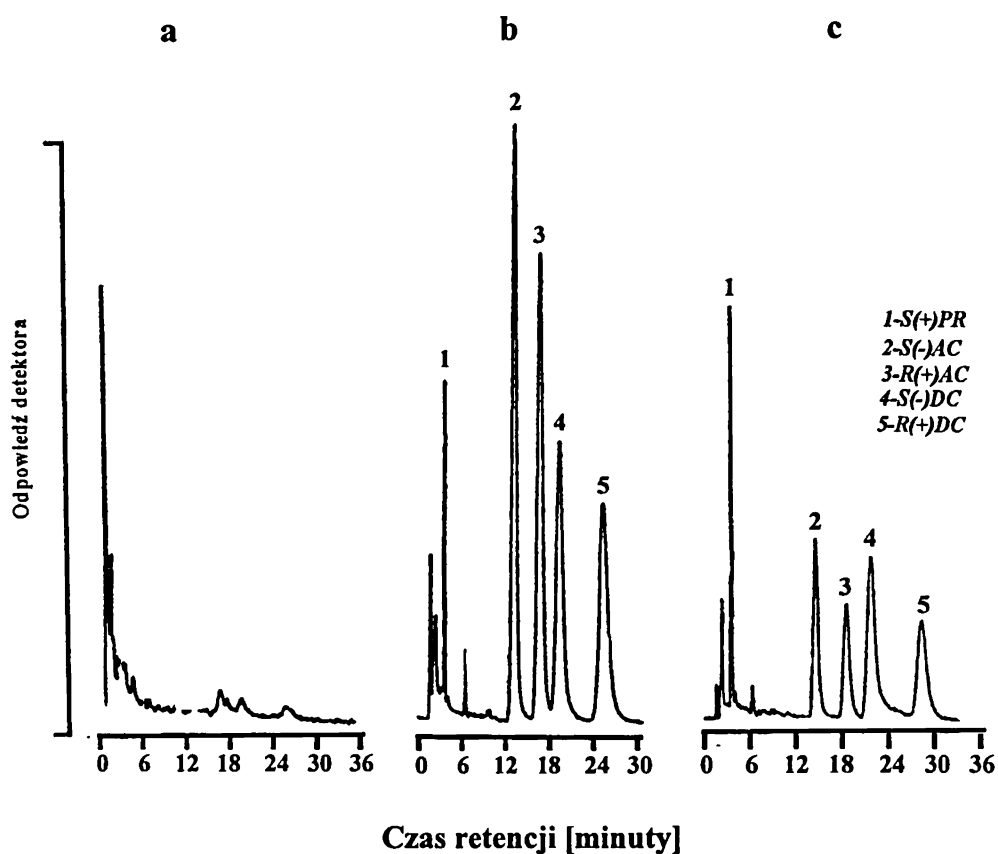
*Rycina 18. Wykresy zależności odpowiedzi detektora UV-VIS od ilości nanoszonych na kolumnę enancjomerów: S(-)-AC i R(+)-AC (a) oraz S(-)-DC i R(+)-DC (b), (metoda bezpośrednia).*

### 6.1.2. Walidacja metody

W przeprowadzonych warunkach analizy chromatograficznej z zastosowaniem metody bezpośredniej rozdzielania enancjomerów AC i DC uzyskano pełny i zadawalający rozdział badanych związków (rycina 19a). Nie stwierdzono interferencji oznaczanych enancjomerów AC i DC oraz enancjomeru S(+)-PR zarówno z substancjami endogennymi zawartymi w matrycy biologicznej (rycina 19b i 19c oraz 20a i 20b), jak również innymi lekami podawanymi równocześnie z oznaczanymi związkami oraz ich metabolitami (ryc. 19d i 20c).



**Rycina 19.** Przykładowe chromatogramy: próbki wzorcowej enancjomerów AC i DC o stężeniu 250 ng/mL oraz IS o stężeniu 300 ng/L (a), osocza kontrolnego (bez leku) (b), osocza zawierającego enancjomery AC i DC o stężeniu 250 ng/mL oraz IS o stężeniu 300 ng/mL (c), osocza pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (d).



*Rycina 20. Przykładowe chromatogramy: pełnej krwi kontrolnej (bez leku) (a), pełnej krwi zawierającej enancjomery AC i DC o stężeniu 250 ng/mL oraz IS o stężeniu 300 ng/mL (b), pełnej krwi pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (c).*

**Tabela 18. Parametry jakości rozdziłu chromatograficznego badanych związków.**

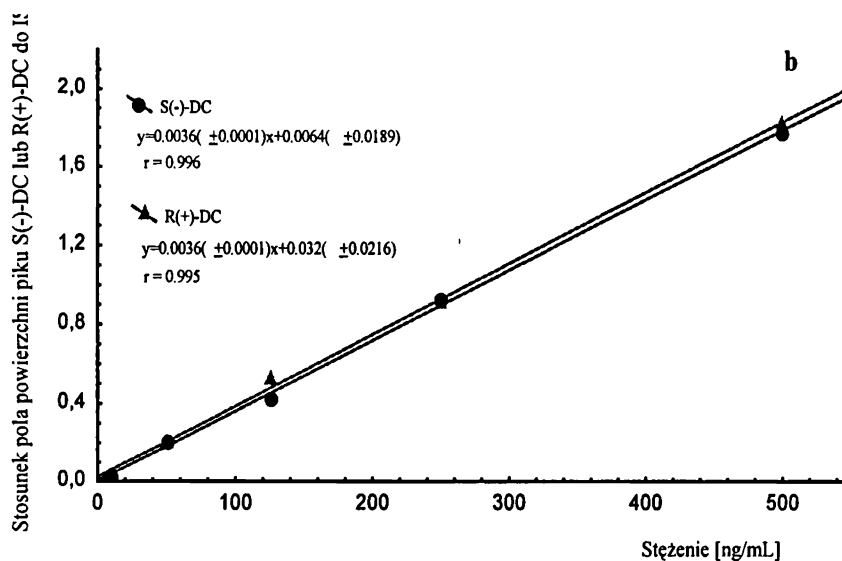
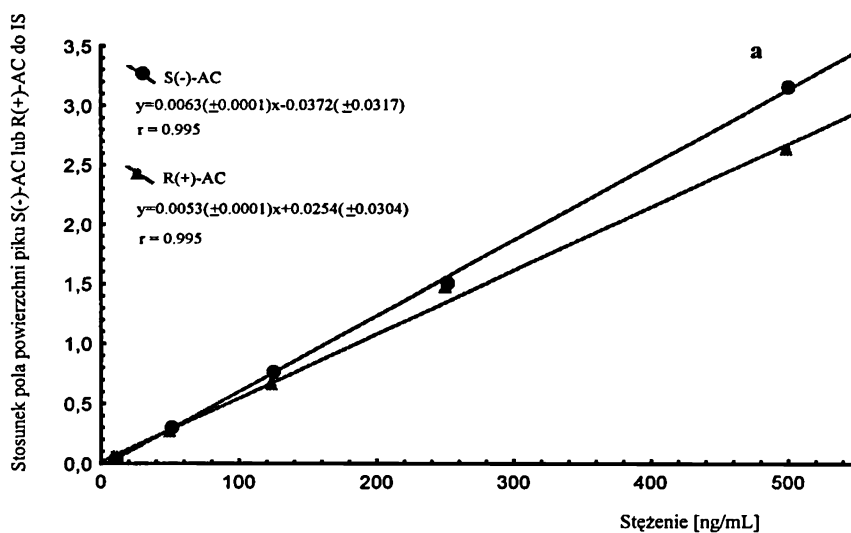
Enancjomery	Parametry*							
	Osocze				Krew			
	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	R <sub>S</sub>	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	α	R <sub>S</sub>
AC	3.7	5.3	1.4	11.1	3.9	5.1	1.6	11.3
DC	6.3	8.3	1.3	10.4	6.5	8.7	1.4	10.2

\* przedstawione wartości parametrów stanowią średnią z 6 pomiarów.

Z wartości zebranych w tabeli 18 wynika, że obliczone parametry rozdziłu dla bezpośredniej metody oznaczania enancjomerów AC i DC zarówno w osoczu, jak również pełnej krwi spełniały przyjęte kryteria, świadczące o tym, że jakość rozdziłu chromatograficznego w podanych warunkach analizy była

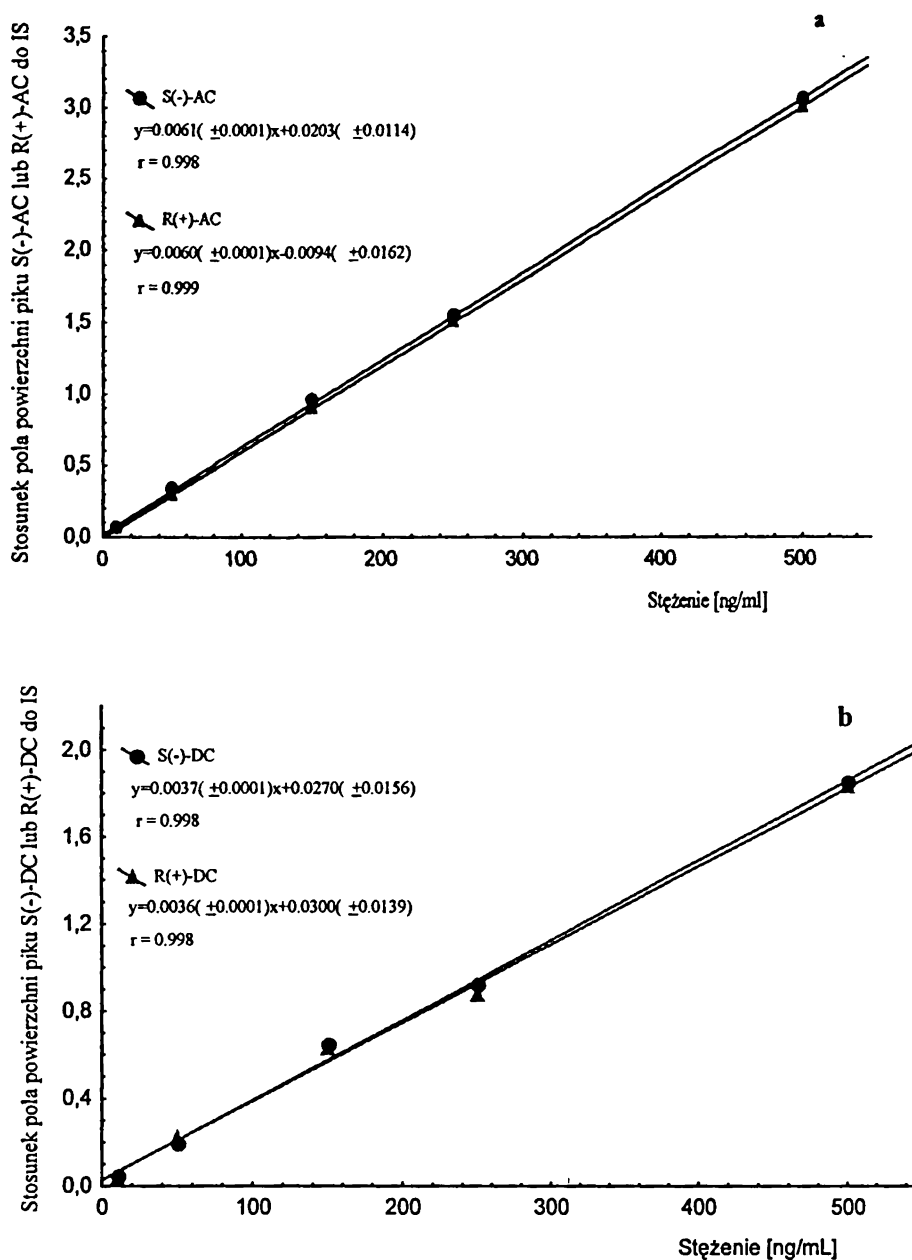
zadawalająca.

Krzywe wzorcowe enancjomerów AC i DC wyznaczone dla osocza (ryc. 21) oraz dla pełnej krwi (ryc. 22) były liniowe w zakresie badanych stężeń od 10 do 500 ng/mL. Wartości współczynników korelacji dla tych zależności wahały się od 0.995 do 0.999.



**Rycina 21.** Krzywe wzorcowe enancjomerów S(-)AC i R(+)-AC (a) oraz S(-)DC i R(+)-DC (b) wyznaczone dla osocza (metoda bezpośrednia, detekcja UV-VIS).





**Rycina 22.** Krzywe wzorcowe enancjomerów: S(-)-AC i R(+)-AC (a) oraz S(-)-DC i R(+)-DC (b) wyznaczone dla pełnej krwi.

Jako kryterium dolnej granicy wykrywalności (LOD) omawianej metody analitycznej, przyjęto takie stężenie enancjomeru, dla którego stosunek sygnału do poziomu szumów aparatu wynosił 4 : 1. Dla obydwu enancjomerów, zarówno AC, jak również DC wartość tego parametru wynosiła 5 ng/mL.

Dolną granicę oznaczalności (LOQ) odpowiadającą najniższemu stężeniu

badanych enancjomerów na krzywej wzorcowej, wyznaczono z wartością CV nie przekraczającą 10 % i błędem względnym niższym od 15 %. Wartość tego parametru wahała się pomiędzy  $8.55 \pm 0.46$  ng/ml a  $11.90 \pm 0.26$  zarówno dla enancjomerów AC, jak i DC (tab. 19).

**Tabela 19.** Wartości stężeń dolnej granicy wykrywalności oraz dolnej granicy oznaczalności dla enancjomerów AC i DC w osoczu i pełnej krwi.

Związek	LOD [ng/mL]	Osocze			Krew		
		LOQ ± SD [ng/ml]	CV [%]	Błąd [%]	LOQ ± SD [ng/ml]	CV [%]	Błąd [%]
S(-)-AC	5	9.66±0.49	5.02	- 3.40	9.07±0.70	7.67	- 9.30
R(+)-AC	5	10.41±0.41	3.96	+ 4.10	10.85±0.29	2.64	+ 8.50
S(-)-DC	5	10.62±0.29	2.75	+ 6.20	11.90±0.26	2.19	+12.50
R(+)-DC	5	9.54±0.12	1.29	- 5.40	8.55±0.46	5.34	- 1.45

W tabelach 20 i 21 zebrano wyniki badań precyzji i dokładności opracowanej metody dla oznaczeń poszczególnych enancjomerów wykonanych w osoczu i pełnej krwi, odpowiednio w jednym dniu i w różnych dniach.

**Tabela 20.** Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w osoczu, odpowiednio w jednym dniu i w różnych dniach, (n=6).

Związek	Stężenie [ng/mL]	W jednym dniu			W różnych dniach		
		Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]
S(-)-AC	10	9.85 ± 0.36	3.65	- 1.50	9.66 ± 0.49	5.02	- 3.40
	250	233.73 ± 4.21	1.80	- 6.51	235.73 ± 5.77	2.45	- 5.71
	500	513.80 ± 7.73	1.51	+2.76	506.97 ± 35.20	6.94	+1.39
R(+)-AC	10	10.28 ± 0.40	3.85	+2.80	10.41 ± 0.41	3.96	+4.10
	250	261.62 ± 4.21	1.61	+4.65	272.13 ± 14.52	5.33	+8.85
	500	478.97 ± 6.93	1.45	- 4.21	490.13 ± 22.22	4.53	- 1.97
S(-)-DC	10	10.51 ± 0.24	2.32	+5.10	10.62 ± 0.29	2.75	+6.20
	250	264.94 ± 7.21	2.72	+5.98	256.40 ± 14.24	5.55	+2.56
	500	474.22 ± 19.25	4.06	- 5.16	492.73 ± 30.27	6.14	- 1.45
R(+)-DC	10	9.48 ± 0.07	0.75	- 5.20	9.54 ± 0.12	1.29	- 5.40
	250	251.65 ± 8.00	3.18	+0.66	253.65 ± 12.03	4.74	+1.46
	500	504.32 ± 15.87	3.15	+0.86	497.80 ± 36.44	7.32	- 0.44

**Tabela 21. Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w pełnej krwi, odpowiednio w jednym dniu i w różnych dniach, (n=6).**

Związek	Stężenie [ng/mL]	W jednym dniu			W różnych dniach		
		Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]
S(-)-AC	10	8.84 ± 0.63	7.17	-11.60	9.07 ± 0.70	7.67	-9.30
	250	246.62 ± 3.37	1.36	-1.35	249.16 ± 5.77	2.32	-0.34
	500	496.11 ± 6.29	1.27	-0.78	498.57 ± 7.11	1.43	-0.29
R(+)-AC	10	10.75 ± 0.24	2.19	+7.50	10.85 ± 0.29	2.64	+8.50
	250	248.82 ± 1.37	0.55	-0.47	251.85 ± 6.16	2.45	+0.74
	500	509.41 ± 9.79	1.92	+1.88	502.89 ± 15.30	3.04	+0.58
S(-)-DC	10	10.81 ± 0.24	2.00	+8.10	10.90 ± 0.26	2.19	+9.00
	250	245.03 ± 6.42	2.62	-1.99	240.78 ± 9.97	4.14	-3.69
	500	497.46 ± 4.62	0.93	-0.51	492.25 ± 11.08	2.25	-1.55
R(+)-DC	10	9.48 ± 0.07	0.75	-5.20	8.55 ± 0.46	5.34	-1.45
	250	251.65 ± 8.00	3.18	+0.66	235.47 ± 6.75	2.87	-5.81
	500	504.32 ± 15.87	3.15	+0.86	499.23 ± 5.79	1.16	-0.15

Z wartości zestawionych w powyższych tabelach 20 i 21 wynika, że opracowana bezpośrednia metoda oznaczania enancjomerów AC i DC zarówno w osoczu, jak również pełnej krwi charakteryzuje się zadawalającą precyzją, współczynnik zmienności był niższy od 10 % oraz wymaganą dokładnością, błąd względny nie przekraczał 15 %.

W tabelach 22 i 23 zebrano wyniki badań wydajności procesu ekstrakcji analizowanych enancjomerów, odpowiednio z osocza i pełnej krwi.

**Tabela 22. Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów AC i DC z osocza, (n=6).**

Związek	Odzysk [%] ± SD		
	10 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL
S(-)-AC	88.17 ± 3.87	80.85 ± 6.82	80.80 ± 6.80
R(+)-AC	78.73 ± 4.94	81.66 ± 5.88	82.77 ± 5.04
S(-)-DC	81.55 ± 5.47	75.88 ± 5.84	78.44 ± 5.40
R(+)-DC	81.77 ± 6.29	74.88 ± 6.66	76.22 ± 4.60

**Tabela 23. Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów**

*AC i DC z pełnej krwi, (n=6).*

Związek	Odzysk [%] ± SD		
	10 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL
S(-)-AC	89.27 ± 4.87	79.12 ± 4.56	80.85 ± 6.85
R(+)-AC	88.11 ± 5.94	77.80 ± 3.55	80.12 ± 5.02
S(-)-DC	82.51 ± 4.42	75.52 ± 5.23	79.41 ± 5.22
R(+)-DC	81.22 ± 5.29	83.72 ± 5.44	76.33 ± 5.45

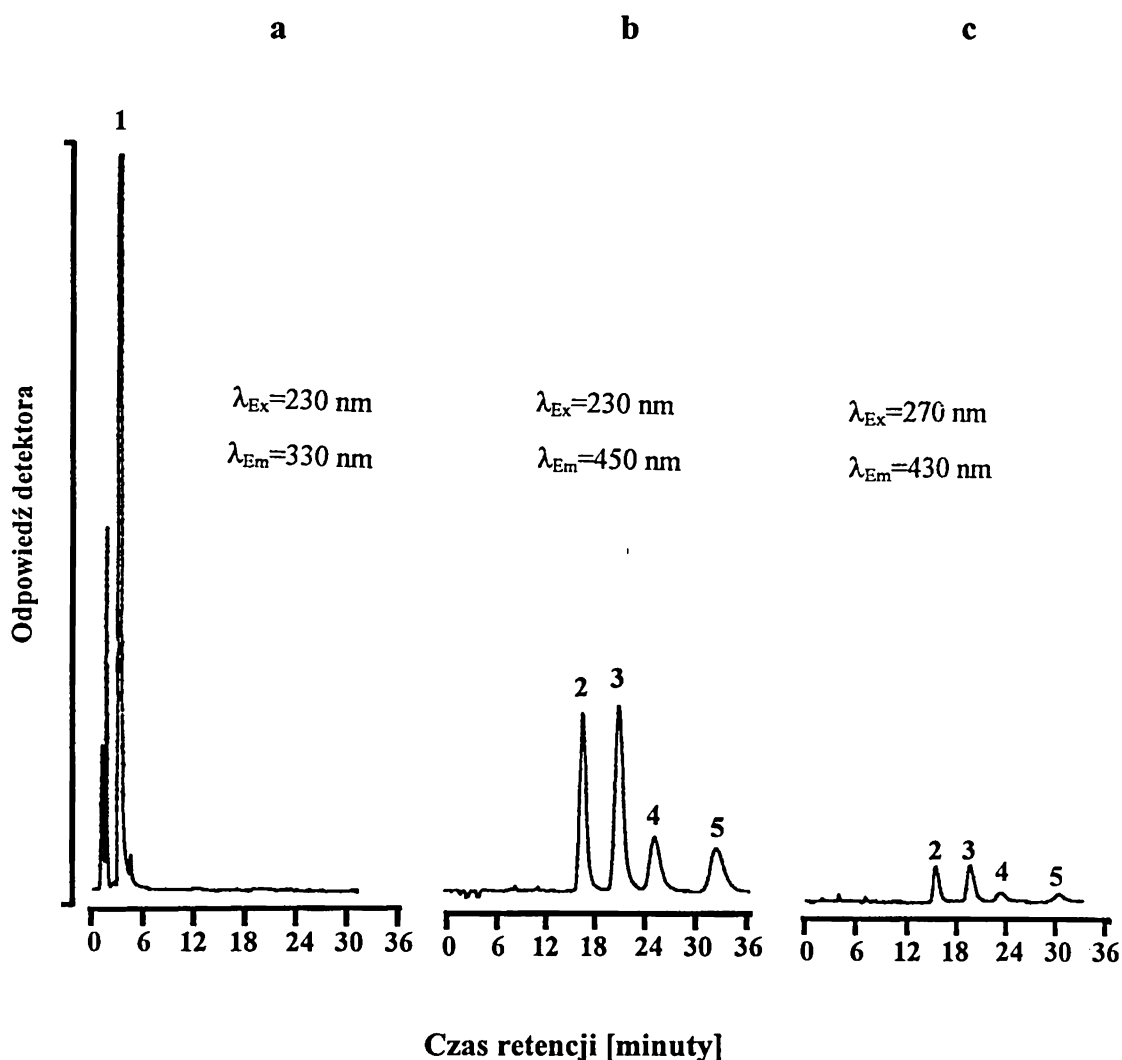
Dane zebrane w tabelach 22 i 23 potwierdziły, że opracowaną metodykę ekstrakcji charakteryzuje wysoka wydajność tego procesu dla wszystkich badanych enancjomerów, zarówno z osocza, jak również pełnej krwi.

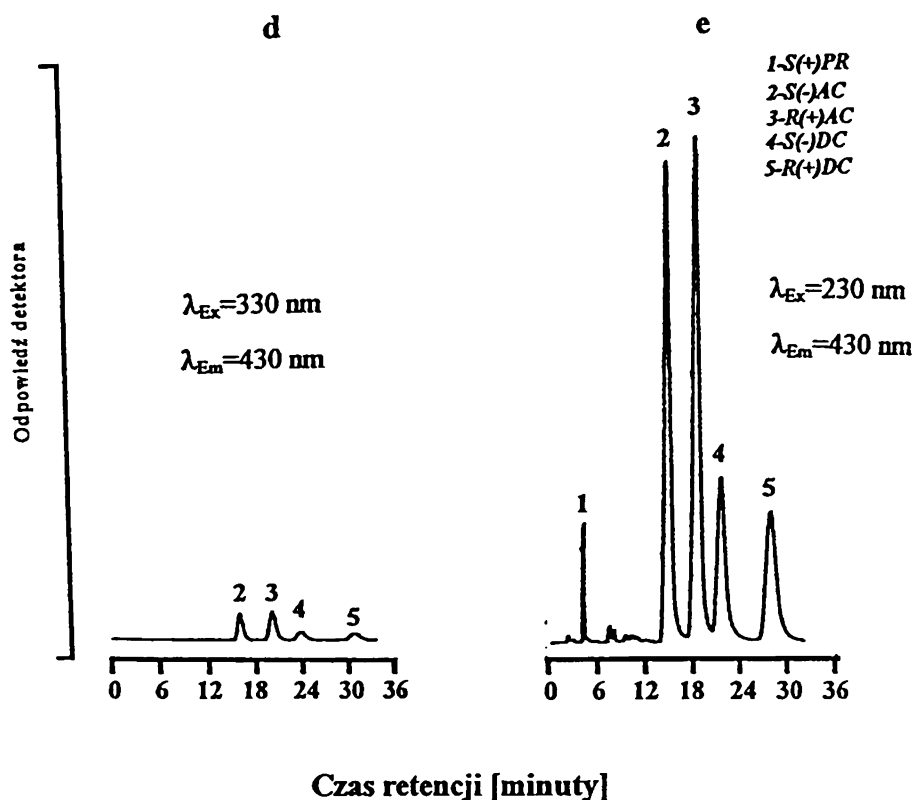
Analogiczne badania wydajności procesu ekstrakcji przeprowadzone z osocza i pełnej krwi dla standardu wewnętrznego, którym był izomer S(+)-propranololu o stężeniu 300 ng/ml wykazały, że przyjęta procedura ekstrakcji zapewnia jego odzysk wynoszący 81.06 % ± 4.36 i 86.72 ± 5.54, przy współczynniku zmienności równym 5.38 % i 8.48 %, odpowiednio dla badanych matryc biologicznych.

## 7.1. Warunki analizy oraz walidacja bezpośredniej metody oznaczania enancjomerów AC i DC z zastosowaniem detekcji spektrofluorymetrycznej

### 7.1.1. Warunki analizy

Celem ustalenia analitycznej długości fali wzbudzenia i emisji dla badanych związków zmieniano długość fali wzbudzenia w zakresie od  $\lambda_{Ex} = 230$  nm do  $\lambda_{Ex} = 330$  nm oraz długość fali emisji od  $\lambda_{Em} = 330$  nm do  $\lambda_{Em} = 450$  nm (ryc. 23). Optymalna długość fali wzbudzenia i emisji, przy której analizowano zarówno S(+)-PR, jak również enancjomery AC i DC wynosiła odpowiednio:  $\lambda_{Ex} = 230$  nm oraz  $\lambda_{Em} = 430$  nm (ryc. 23e).

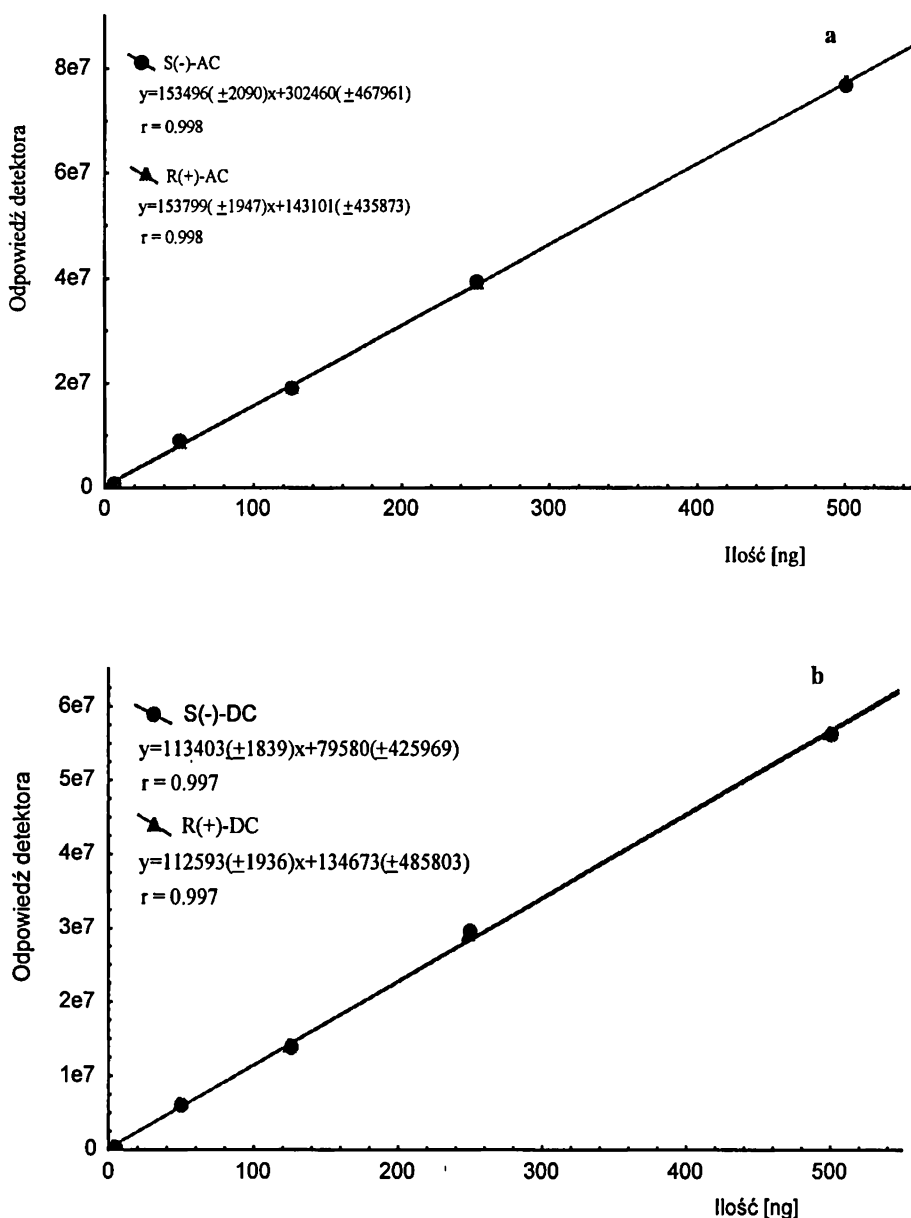




*Rycina 23. Przykładowe chromatogramy przedstawiające zależność odpowiedzi detektora od długości fali wzbudzenia i emisji dla enancjomerów AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz S(+)-PR o stężeniu 2000 ng/mL.*

Fazę ruchomą w tym przypadku stanowiła mieszanina heksanu i etanolu w stosunku objętościowym 91:9 z dodatkiem 1 mL dietyloaminy na 1 litr fazy, przepływająca z szybkością 1.2 mL/min.

Badanie odpowiedzi detektora spektrofluorymetrycznego prowadzone w zakresie od 5 do 500 ng wykazało liniową zależność pomiędzy polami powierzchni otrzymanych pików a ilością enancjomerów AC i DC nanoszoną na kolumnę chiralną. Współczynniki korelacji dla tych zależności wahały się od 0.997 do 0.998, (ryc. 24).

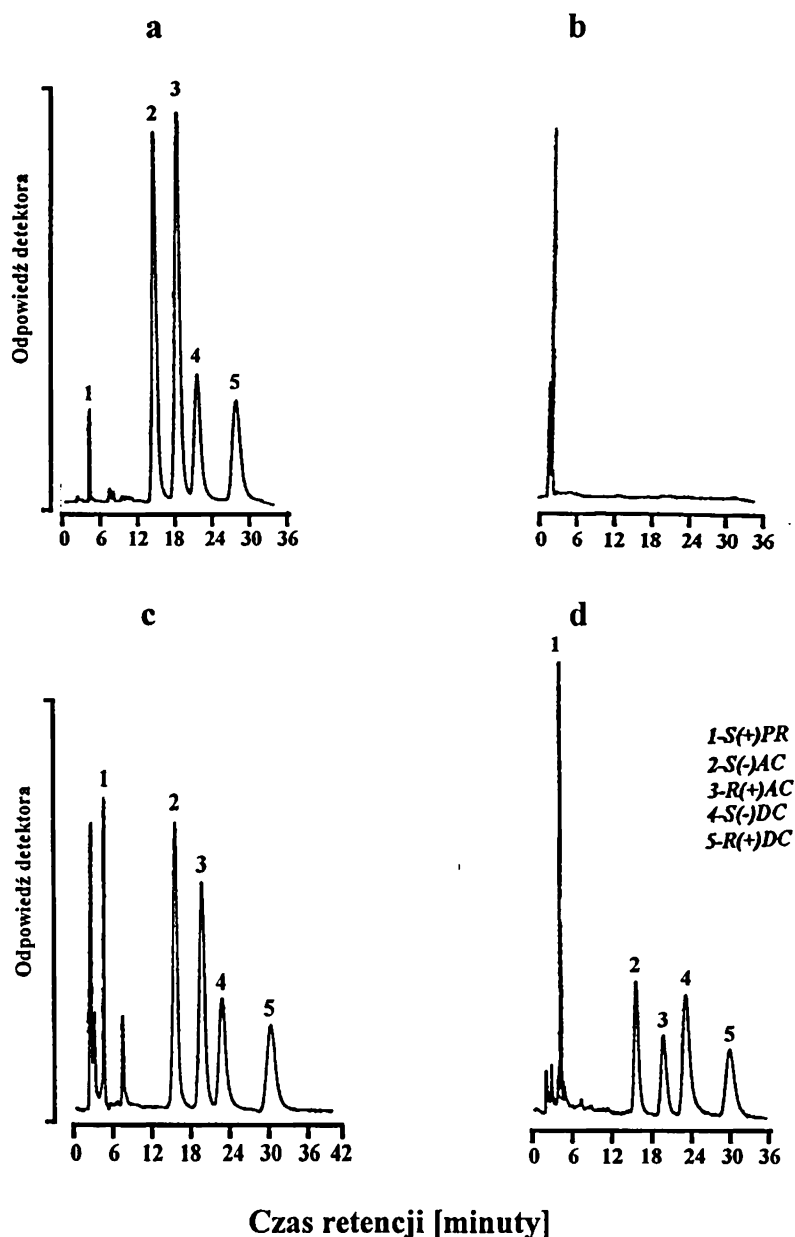


**Rycina 24.** Wykresy zależności odpowiedzi detektora spektrofluorymetrycznego od ilości nanoszonych na kolumnę enancjomerów: S(-)-AC i R(+)-AC (a) oraz S(-)-DC i R(+)-DC (b), (metoda bezpośrednia).

### 7.1.2. Walidacja metody

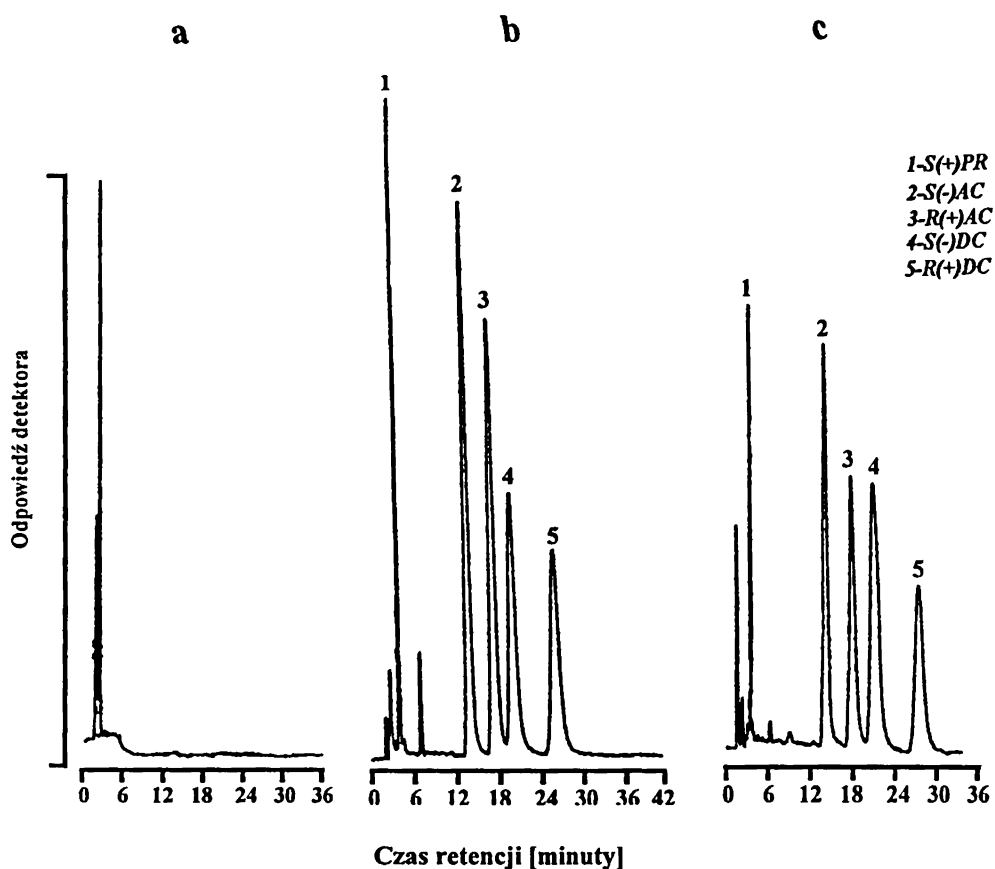
W przeprowadzonych warunkach analizy chromatograficznej z zastosowaniem metody bezpośredniej z detekcją spektrofluorymetryczną

stwierdzono, że sygnały mierzone w trakcie analizy pochodziły wyłącznie od oznaczanych substancji, a rozdział badanych związków był pełny i zadawalający (ryc. 25a). Nie stwierdzono interferencji badanych enancjomerów AC i DC oraz enancjomeru S(+)-PR zarówno z substancjami endogennymi zawartymi w matrycy biologicznej (ryc. 25b i 25c, 26a i 26b oraz 27a i 27b), jak również innymi lekami podawanymi równocześnie z oznaczanymi związkami oraz ich metabolitami (ryc. 25d, 26c oraz 27c).

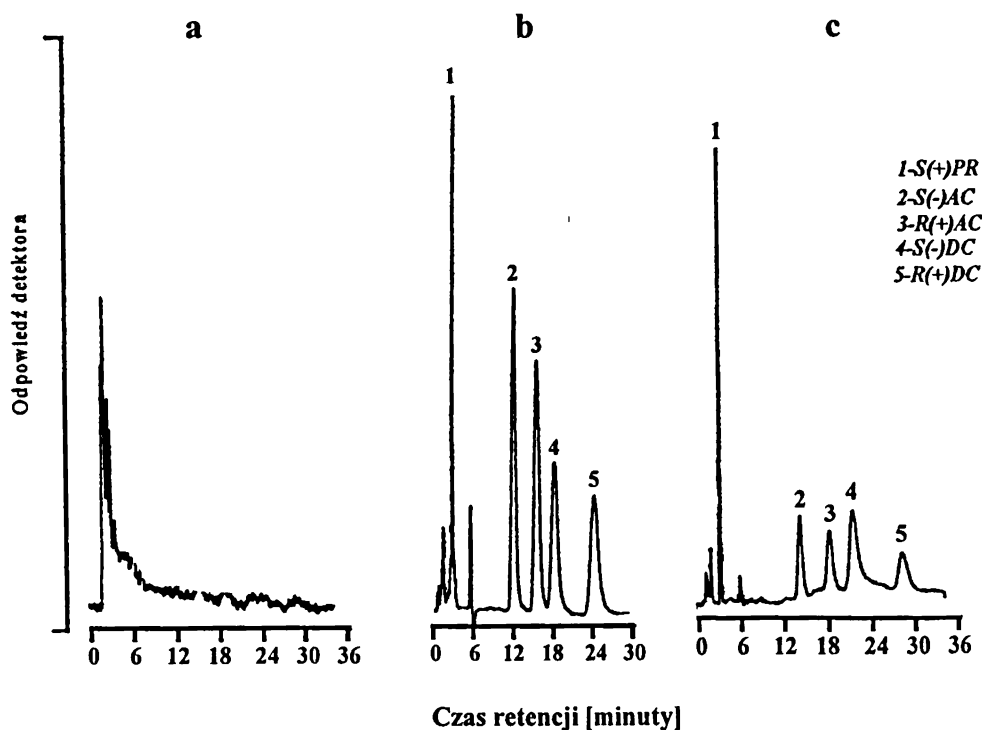


Rycina 25. Przykładowe chromatogramy: próbki wzorcowej enancjomerów AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz IS o stężeniu 2000 ng/mL (a), osocza kontrolnego (bez leku) (b), osocza zawierającego enancjomery AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz IS o stężeniu 2000 ng/mL (c), osocza pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (d), (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofлуorymetryczna).



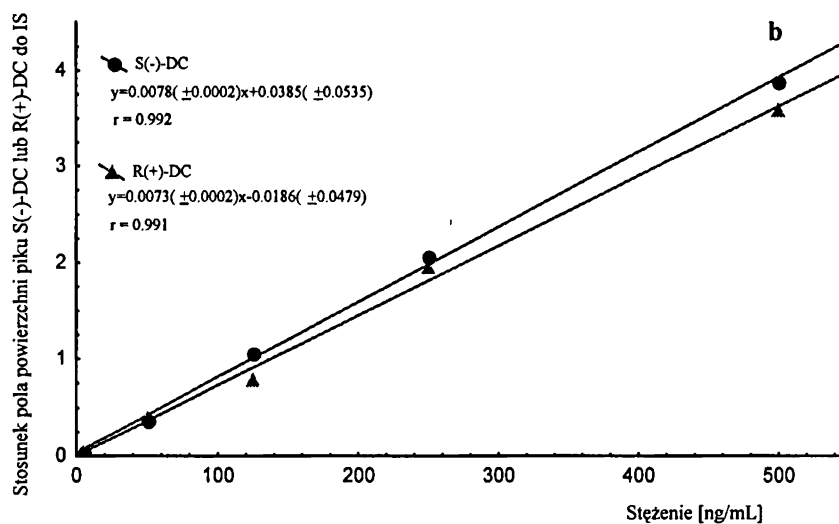
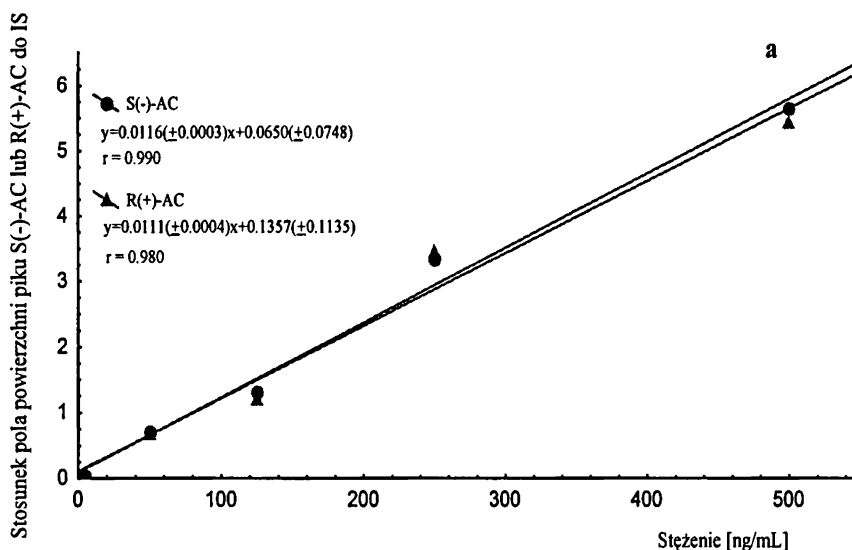


Rycina 26. Przykładowe chromatogramy: próbek pełnej krwi kontrolnej (bez leku) (a), pełnej krwi zawierającej enancjomery *AC* i *DC* o stężeniu 500 ng/mL oraz *IS* o stężeniu 2000 ng/mL (b), pełnej krwi pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (c).

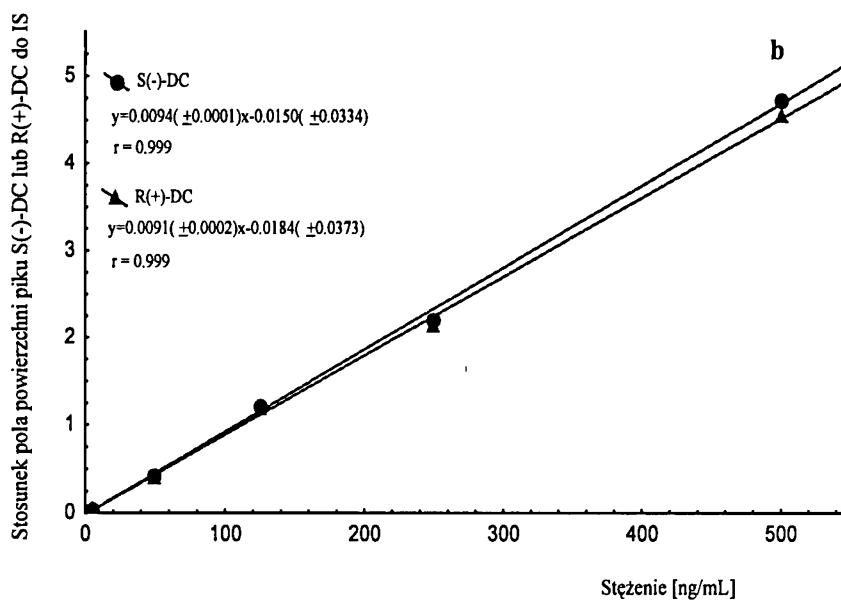
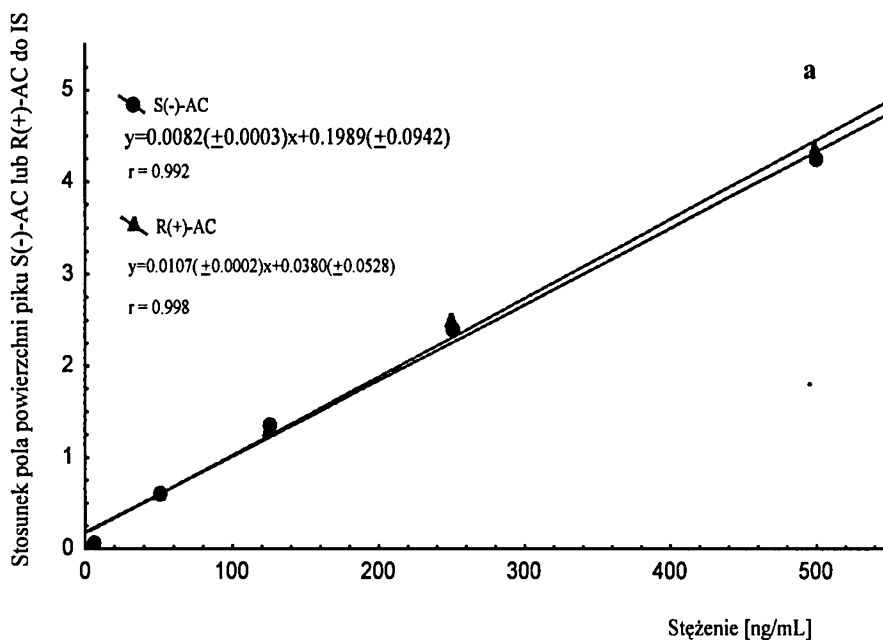


Rycina 27. Przykładowe chromatogramy: próbek erytrocytów (bez leku) (a), erytrocytów zawierających enancjomery *AC* i *DC* o stężeniu 500 ng/mL oraz *IS* o stężeniu 2000 ng/mL (b), erytrocytów pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (c).

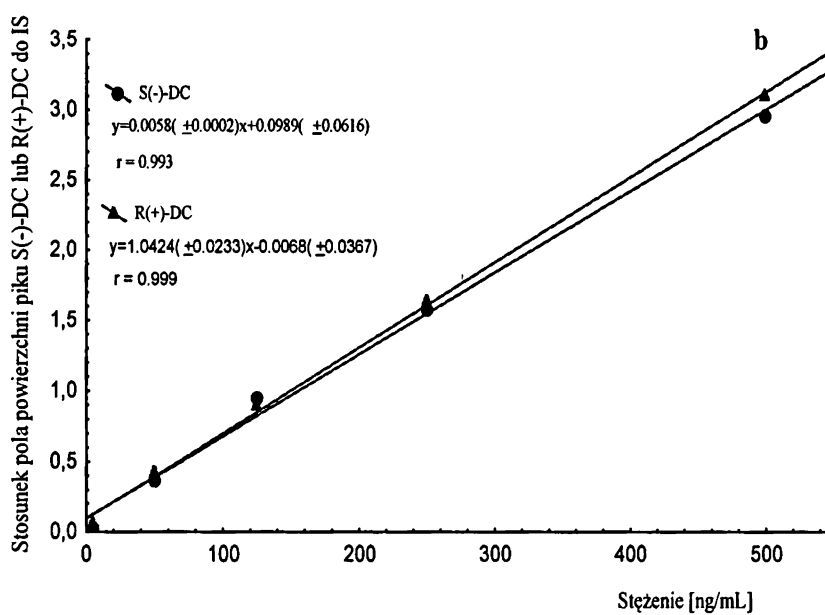
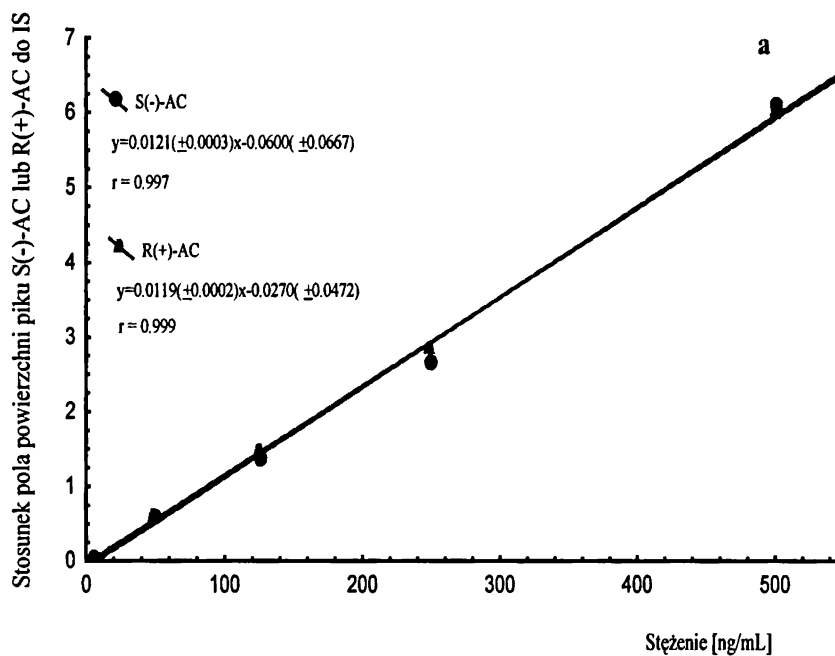
Krzywe wzorcowe enancjomerów AC i DC wyznaczone dla osocza (ryc. 28), pełnej krwi (ryc. 29) oraz erytrocytów (ryc. 30) były liniowe w zakresie badanych stężeń enancjomerów AC oraz DC od 5 do 500 ng/mL. Wartości współczynników korelacji dla tych zależności wahały się od 0.980 do 0.999.



**Rycina 28.** Krzywe wzorcowe enancjomerów S(-)-AC i R(+)-AC (a) oraz enancjomerów S(-)-DC i R(+)-DC (b) wyznaczone dla osocza, z zastosowaniem metody bezpośredniej z detekcją spektrofluorymetryczną.



**Rycina 29.** Krzywe wzorcowe enancjomerów S(-)-AC i S(-)-DC (a) oraz enancjomerów R(+)-AC i R(+)-DC (b) wyznaczone dla pełnej krwi, z zastosowaniem metody bezpośredniej z detekcją spektrofluorymetryczną.



*Rycina 30. Krzywe wzorcowe enancjomerów S(-)-AC i R(+)-AC (a) oraz enancjomerów S(-)-DC i R(+)-DC (b) wyznaczone dla erytrocytów, z zastosowaniem metody bezpośredniej z detekcją spektrofluorymetryczną.*

Dolna granica wykrywalności (LOD), dla enancjomerów AC i DC wynosiła 1 ng/mL, przy stosunku sygnału do poziomu szumów aparatu równym 4:1. Dolną granicę oznaczalności (LOQ), wyznaczono z wymaganą precyzją i dokładnością, współczynnik CV i błąd względny nie przekraczały odpowiednio 10 i 15 %. Wartość LOQ dla badanych enancjomerów w osoczu, pełnej krwi oraz erytrocytach wahała się od  $4.57 \pm 0.40$  ng/mL do  $5.56 \pm 0.22$  ng/mL (tab. 24).

*Tabela 24. Wartości stężeń dolnej granicy wykrywalności oraz dolnej granicy oznaczalności dla enancjomerów AC i DC w osoczu, pełnej krwi i erytrocytach, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofluorymetryczna), (n=6).*

Związek	LOD [ng/mL]	Osocze			Krew			RBC		
		LOQ ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	LOQ ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	LOQ ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]
S(-)-AC	1	5.04 ±0.33	6.45	+ 0.8	5.02 ±0.21	4.08	+0.40	4.99 ±0.70	13.18	- 0.20
R(+)-AC	1	4.99 ±0.40	8.11	- 0.2	4.86 ±0.01	0.29	-2.80	5.43 ±0.40	7.68	+8.60
S(-)-DC	1	4.98 ±0.61	12.33	- 0.4	5.56 ±0.22	3.91	+11.2	5.22 ±0.70	12.5	+4.40
R(+)-DC	1	4.99 ±0.42	8.40	- 0.2	4.91 ±0.35	7.06	-1.80	4.57 ±0.40	8.97	- 8.60

W tabeli 25 przedstawiono wyniki badań precyzji i dokładności opracowanej metody bezpośredniego oznaczania enancjomerów AC i DC w osoczu krwi, odpowiednio w jednym dniu i w różnych dniach. Analogiczne wyniki badań dla oznaczeń wykonanych w pełnej krwi oraz erytrocytach zebrano w tabelach 26 i 27.

**Tabela 25. Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w osoczu, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofлуorymetryczna), (n=6).**

Związek	Stężenie [ng/mL]	W jednym dniu			W różnych dniach		
		Oznaczone Stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]
S(-)-AC	5	4.77 ± 0.16	3.38	- 4.60	5.04 ± 0.33	6.45	+0.80
	250	279.43 ± 7.22	2.58	+11.8	272.72 ± 17.1	6.26	+9.10
	500	495.87 ± 9.45	1.91	- 0.83	480.56 ± 25.4	5.27	- 3.90
R(+)-AC	5	4.69 ± 0.34	7.16	- 6.20	4.99 ± 0.40	8.08	- 0.20
	250	289.87 ± 2.71	0.94	+16.0	283.55 ± 10.0	3.53	+13.4
	500	490.56 ± 25.5	5.19	- 1.89	470.65 ± 30.4	6.46	- 5.87
S(-)-DC	5	4.68 ± 0.42	8.91	- 6.40	4.98 ± 0.61	12.33	- 0.40
	250	272.48 ± 15.1	5.54	+9.00	260.10 ± 21.0	8.06	+4.04
	500	472.08 ± 34.5	7.32	- 5.58	493.47 ± 45.3	9.19	- 1.31
R(+)-DC	5	5.19 ± 0.03	0.60	+3.80	4.99 ± 0.42	8.40	- 0.20
	250	284.23 ± 4.07	1.43	+13.7	269.50 ± 19.2	7.12	+7.80
	500	523.47 ± 9.41	1.80	+4.70	493.82 ± 42.2	8.52	- 1.24

**Tabela 26. Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w pełnej krwi, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofлуorymetryczna), (n=5).**

Związek	Stężenie [ng/mL]	W jednym dniu			W różnych dniach		
		Oznaczone Stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]
S(-)-AC	5	4.56 ± 0.15	3.30	- 8.80	5.02 ± 0.21	4.08	+0.40
	250	269.43 ± 4.21	1.56	+7.77	225.86 ± 20.0	8.87	- 9.66
	500	510.12 ± 7.14	1.40	+2.02	507.47 ± 15.9	3.14	+1.49
R(+)-AC	5	4.58 ± 0.56	12.22	- 8.40	4.86 ± 0.01	0.29	- 2.80
	250	255.81 ± 2.33	0.91	+2.32	239.90 ± 3.14	1.31	- 4.04
	500	492.54 ± 21.5	4.36	- 1.49	502.87 ± 20.1	4.00	+0.57
S(-)-DC	5	4.66 ± 0.41	8.80	- 6.80	5.56 ± 0.22	3.91	+11.2
	250	271.40 ± 5.10	1.88	+8.56	237.48 ± 1.70	0.71	- 5.01
	500	483.08 ± 31.2	6.46	- 3.38	504.96 ± 16.1	3.20	+1.00
R(+)-DC	5	5.66 ± 0.38	6.71	+13.2	4.91 ± 0.35	7.06	- 1.80
	250	257.23 ± 4.02	1.56	+2.89	237.65 ± 4.67	1.97	- 4.94
	500	511.50 ± 9.21	1.80	+2.30	501.38 ± 16.8	3.35	+0.28

**Tabela 27. Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w erytrocytach, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofлуometryczna), (n=5).**

Związek	Stężenie [ng/mL]	W jednym dniu			W różnych dniach		
		Oznaczone Stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]	Oznaczone stężenie ± SD [ng/mL]	CV [%]	Błąd [%]
S(-)-AC	5	4.36 ± 0.25	5.73	- 12.8	4.99 ± 0.66	13.18	- 0.20
	250	266.43 ± 4.11	1.54	+6.57	267.70 ± 23.6	8.82	+7.08
	500	520.12 ± 6.14	1.18	+4.02	490.38 ± 37.7	7.69	- 1.92
R(+)-AC	5	4.38 ± 0.33	7.53	- 12.4	5.43 ± 0.42	7.68	+8.60
	250	246.82 ± 2.56	1.04	- 1.27	256.90 ± 21.0	8.15	+2.76
	500	489.54 ± 20.4	4.17	- 2.09	495.66 ± 4.96	1.00	- 0.87
S(-)-DC	5	4.62 ± 0.38	8.23	- 7.60	5.22 ± 0.65	12.50	+4.40
	250	261.43 ± 5.02	1.92	+4.57	254.07 ± 22.8	8.97	+1.63
	500	493.08 ± 29.2	5.92	- 1.38	493.81 ± 46.6	9.43	- 1.24
R(+)-DC	5	5.50 ± 0.35	6.36	+10.0	4.57 ± 0.41	8.97	- 8.60
	250	247.23 ± 4.05	1.64	- 1.11	237.81 ± 13.2	5.55	- 4.88
	500	506.51 ± 9.14	1.81	+1.30	500.20 ± 10.7	2.13	+0.04

Z wartości zestawionych w tabelach 25, 26 i 27 wynika, że opracowana metoda bezpośredniego oznaczania enancjomerów AC i DC w osoczu, pełnej krwi oraz erytrocytach, z zastosowaniem detekcji spektrofлуometrycznej, charakteryzuje się zadawalającą precyzją, współczynnik zmienności dla niskich stężeń był mniejszy od 15 %, natomiast dla wysokich nie przekraczał 10 % oraz wymaganą dokładnością, błąd względny nie przekraczał 15 %.

W tabeli 28 zebrano wyniki badań wydajności procesu ekstrakcji analizowanych enancjomerów z osocza. Analogiczne wyniki dla oznaczeń wykonanych w pełnej krwi oraz erytrocytach przedstawiono w tabelach 29 i 30.

**Tabela 28. Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów AC i DC z osocza, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofлуometryczna).**

Związek	Odzysk [%] ± SD, (n=6)		
	5 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL
S(-)-AC	78.16 ± 2.87	79.85 ± 5.82	78.53 ± 4.20
R(+)-AC	79.75 ± 5.94	80.68 ± 5.23	79.69 ± 4.01
S(-)-DC	82.56 ± 6.47	75.87 ± 6.84	71.17 ± 5.08
R(+)-DC	80.97 ± 5.29	74.80 ± 6.13	73.67 ± 6.82

**Tabela 29.** Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów AC i DC z pełnej krwi, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofluorymetryczna).

Związek	Odzysk [%] ± SD, (n=6)		
	5 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL
S(-)-AC	80.76 ± 3.87	79.80 ± 5.88	79.57 ± 4.25
R(+)-AC	79.88 ± 4.88	81.60 ± 5.20	79.80 ± 4.24
S(-)-DC	81.50 ± 5.40	78.80 ± 5.84	75.02 ± 5.01
R(+)-DC	81.90 ± 5.66	74.80 ± 6.13	75.22 ± 6.33

**Tabela 30.** Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów AC i DC z erytrocytów, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofluorymetryczna).

Związek	Odzysk [%] ± SD, (n=6)		
	5 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL
S(-)-AC	80.56 ± 3.88	78.88 ± 6.82	77.53 ± 4.25
R(+)-AC	79.11 ± 4.88	81.66 ± 4.23	76.96 ± 4.11
S(-)-DC	86.50 ± 6.90	78.85 ± 5.84	75.17 ± 6.08
R(+)-DC	83.77 ± 5.20	75.81 ± 5.13	75.67 ± 5.82

Dane zawarte w tabelach 28, 29 oraz 30 potwierdziły wysoką wydajność procesu ekstrakcji badanych enancjomerów AC i DC, zarówno z osocza, pełnej krwi, jak również zawiesiny erytrocytów.

Analogiczne badania wydajności procesu ekstrakcji przeprowadzone z odpowiedniej matrycy biologicznej dla standardu wewnętrznego, którym był izomer S(+)-propranololu o stężeniu 2000 ng/mL potwierdziły, że przyjęta procedura ekstrakcji zapewnia jego odzysk wynoszący od 83.06 % ± 3.23 do 86.02 ± 4.24, przy współczynniku zmienności wynoszącym od 3.90 od 6.84 dla każdej z badanych matryc biologicznych.

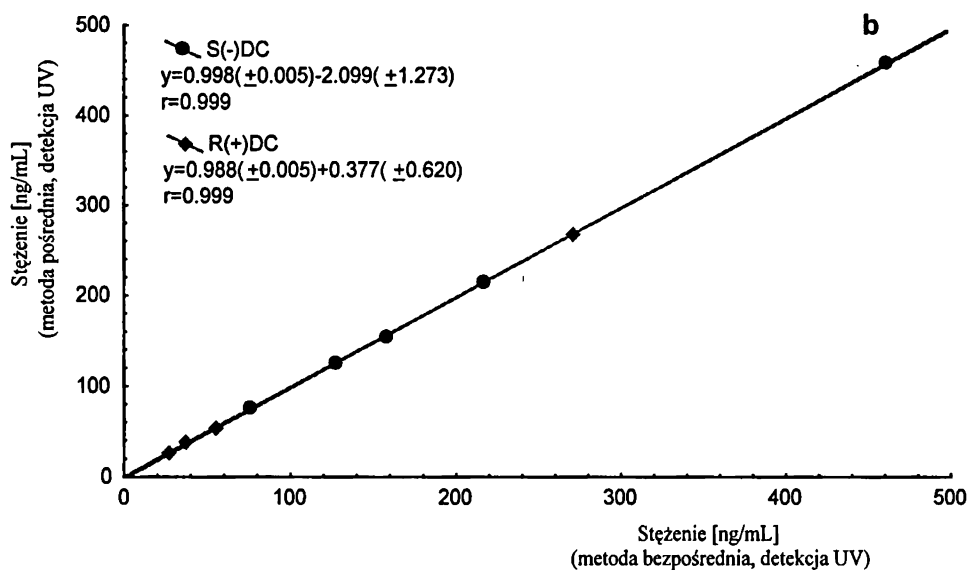
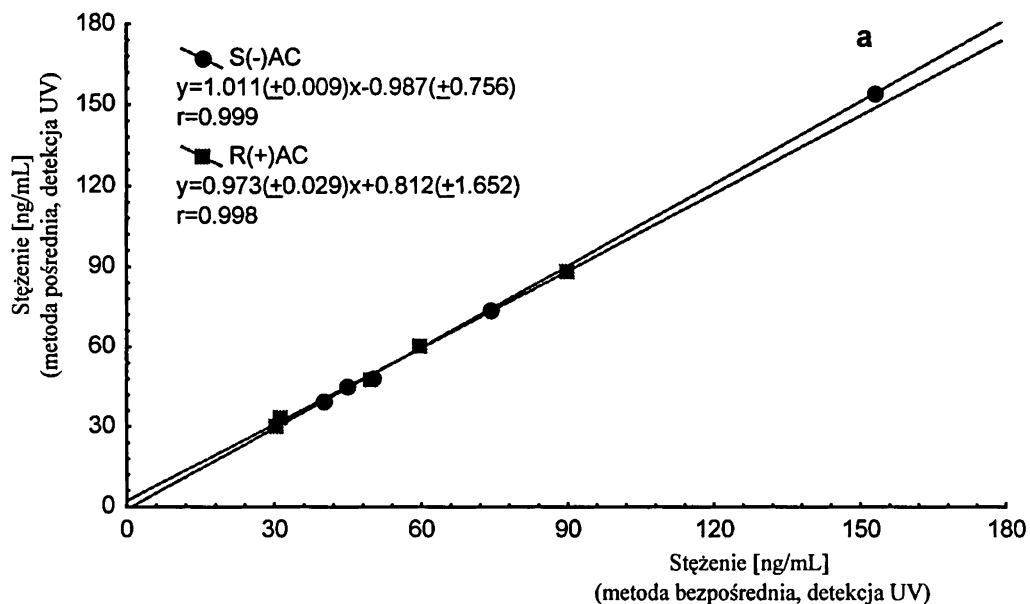


Celem wzajemnego porównania metod enancjoselektywnego oznaczania enancjomerów AC i DC, minimalne stężenia stacjonarne ( $C_{\min}$ ) badanych enancjomerów w osoczu, w grupie 5 chorych, analizowano z wykorzystaniem każdej z opracowanych metod.

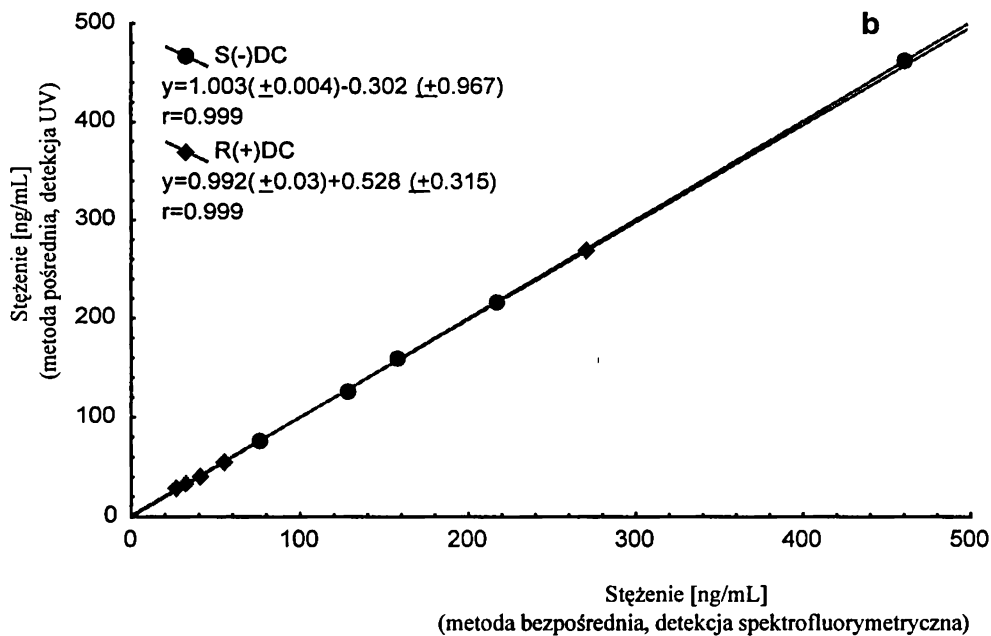
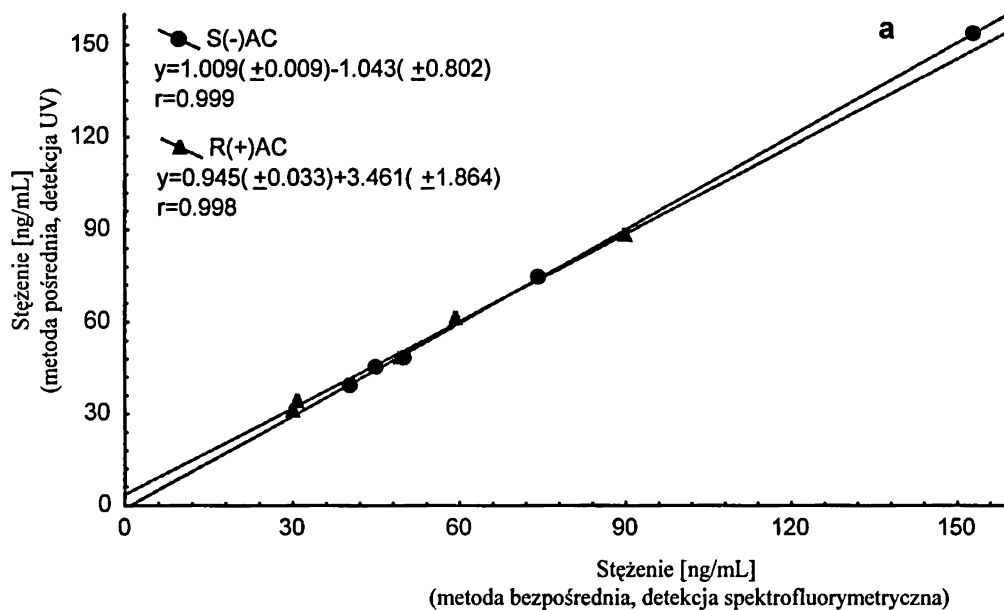
Porównanie metody pośredniej z metodą bezpośrednią, w których zastosowano detekcję UV-VIS przedstawiono na rycinie 31.

Analogiczne porównanie metody pośredniej (detekcja UV-VIS) z metodą bezpośrednią (detekcja spektrofluorymetryczna) przedstawiono na rycinie 32, natomiast porównanie metod bezpośredniego rozdziału badanych enancjomerów, odpowiednio z wykorzystaniem detekcji UV-VIS oraz spektrofluorymetrycznej przedstawiono na rycinie 33.

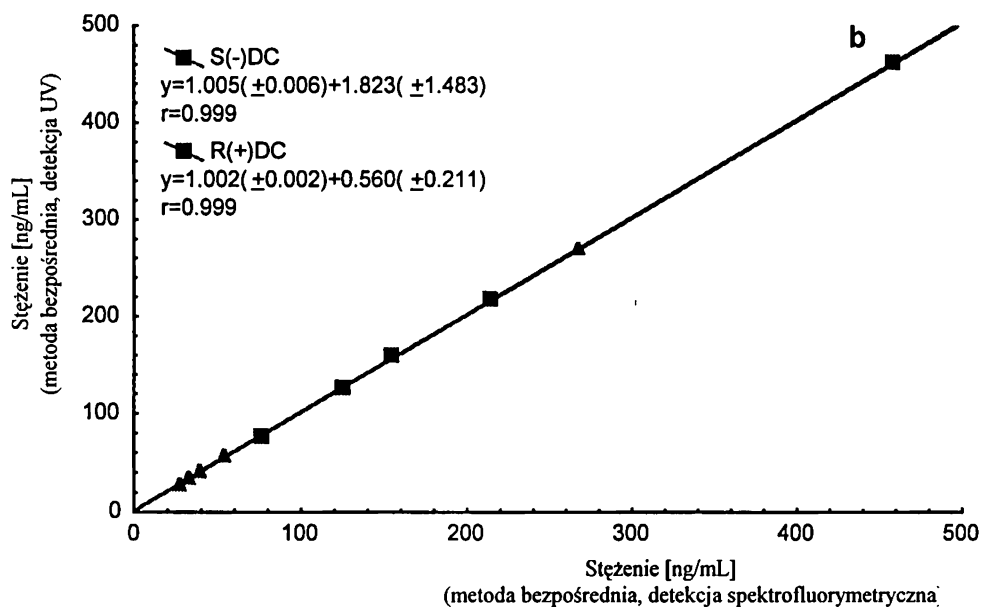
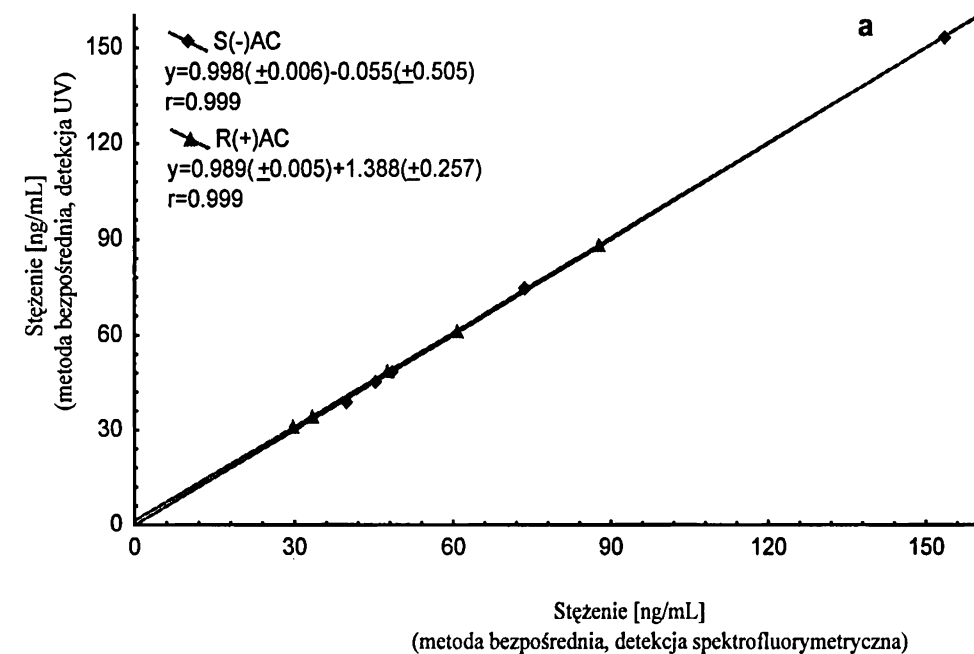
Statystyczne porównanie opracowanych metod przeprowadzono z zastosowaniem dwuczynnikowej analizy wariancji w układzie hierarchicznym. Analiza statystyczna wykazała, że stężenia enancjomerów AC i DC oznaczone za pomocą każdej z tych metod są sobie równoważne ( $p > 0.05$ ).



**Rycina 31.** Wykresy zależności pomiędzy stężeniem enancjomerów AC (a) i enancjomerów DC (b) oznaczanych w osoczu, odpowiednio metodą pośrednią oraz metodą bezpośrednią, z zastosowaniem detekcji UV-VIS.



**Rycina 32.** Wykresy zależności pomiędzy stężeniem enancjomerów AC (a) i enancjomerów DC (b) oznaczanych w osoczu, odpowiednio metodą pośrednią z detekcją UV-VIS oraz metodą bezpośrednią z detekcją spektrofluorymetryczną.



**Rycina 33.** Wykresy zależności pomiędzy stężeniem enancjomerów AC (a) i enancjomerów DC (b) oznaczanych w osoczu, odpowiednio metodą bezpośrednią z detekcją UV-VIS oraz metodą bezpośrednią z detekcją spektrofluorymetryczną.

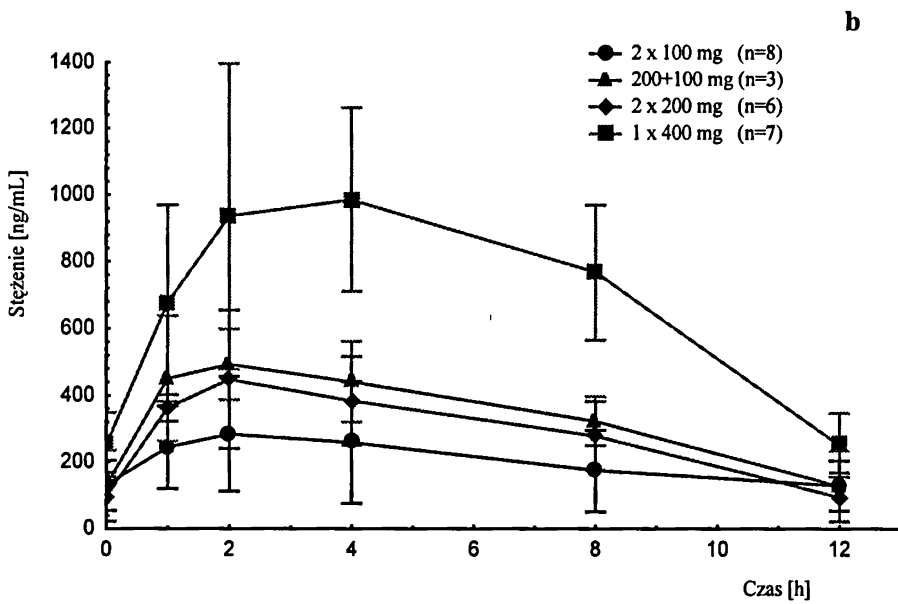
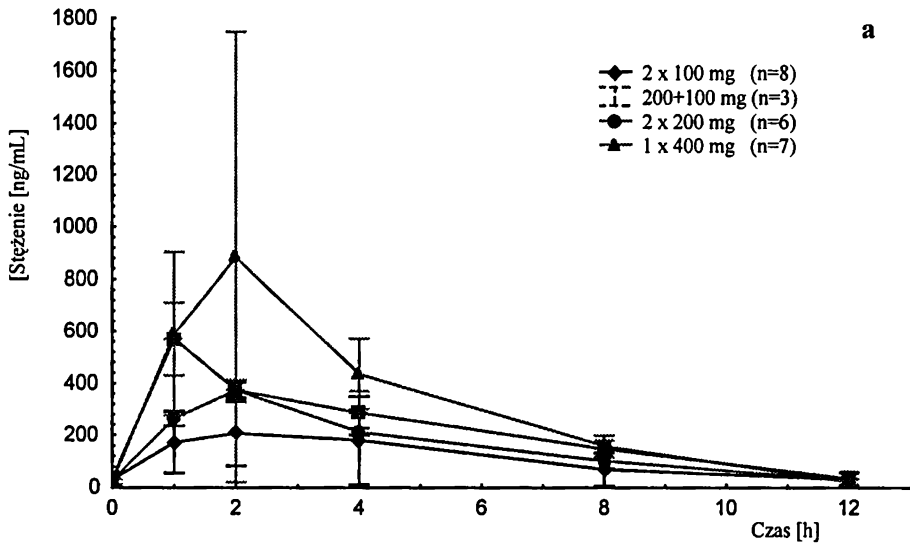
### 8.1. Ocena farmakokinetyki AC oraz DC u chorych na podstawie stężeń oznaczanych metodą achiralną

W tabeli 31 zebrano dane demograficzne grupy 24 chorych u których oznaczano stężenia stacjonarne racemicznego AC oraz DC w osoczu i pełnej krwi metodą achiralną, po różnych czasach od podania leku macierzystego.

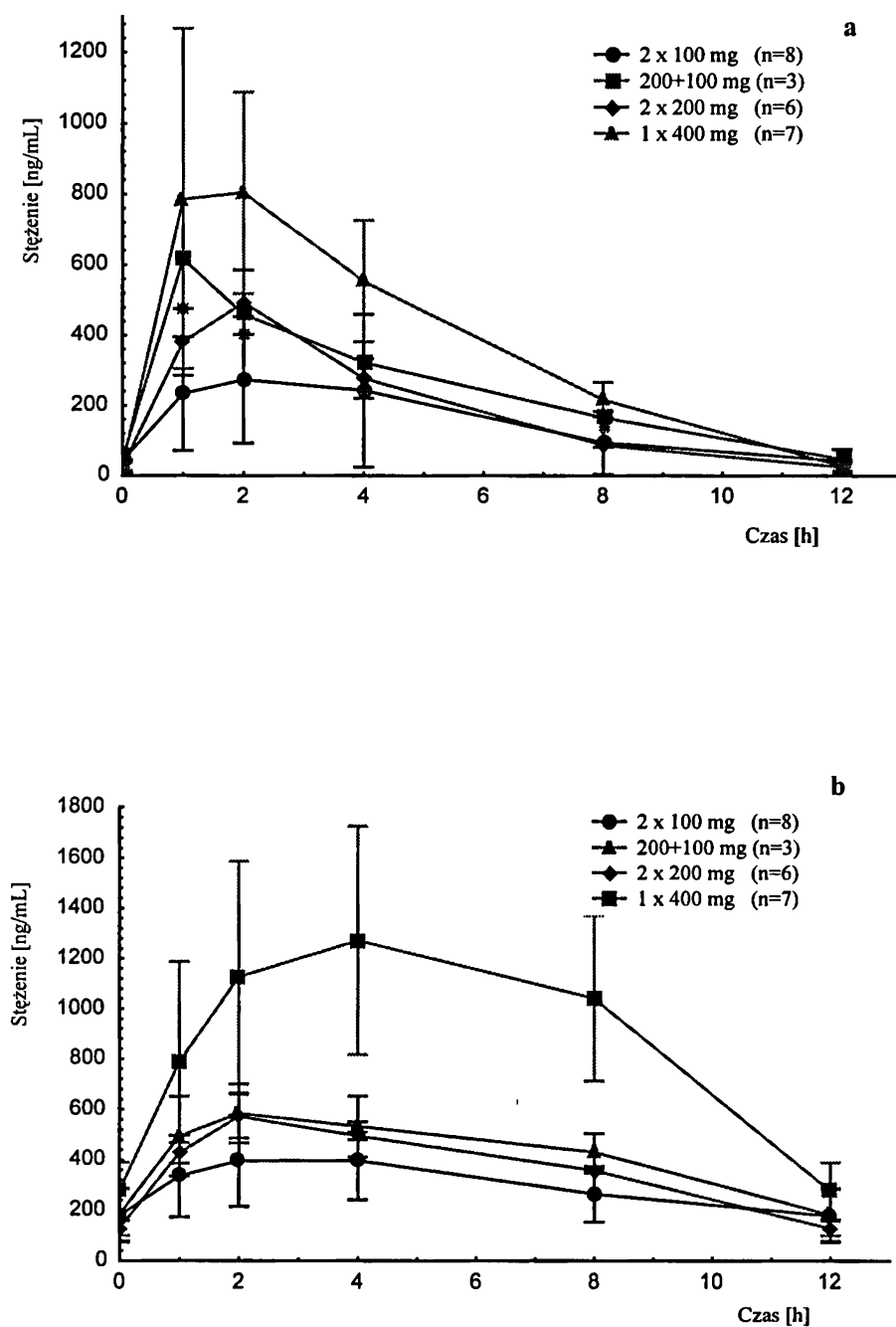
*Tabela 31. Dane demograficzne chorych leczonych acebutololem.*

L.p.	Płeć	Wiek [lata]	Waga [kg]	Wzrost [cm]	Klirens kreatyniny [mL/min]
1	k	42	68	150	88.52
2	k	61	63	157	91.21
3	k	46	68	158	100.45
4	m	34	70	184	87.12
5	m	19	78	182	96.13
6	m	43	69	178	87.44
7	k	59	75	161	83.55
8	k	63	54	164	82.15
9	m	23	65	181	78.44
10	m	23	100	179	77.14
11	m	31	65	180	88.66
12	k	59	72	165	82.11
13	k	49	75	164	95.22
14	k	46	83	168	101.12
15	m	26	80	180	75.96
16	k	58	68	164	88.63
17	k	43	58	162	86.23
18	m	60	80	170	103.66
19	m	64	70	170	112.55
20	m	34	75	165	74.56
21	m	63	74	176	88.64
22	k	30	55	165	79.55
23	m	32	68	172	81.33
24	m	58	72	169	96.15

Na rycinie 34 przedstawiono wykresy zależności średnich wartości stężeń stacjonarnych racemicznego AC oraz DC jako funkcja czasu, oznaczanych w osoczu badanych chorych, w stanie stacjonarnym, po różnych czasach od podania ostatniej dawki leku macierzystego. Analogiczne zależności otrzymane dla pełnej krwi przedstawiono na rycinie 35.



**Rycina 34.** Zależność średnich wartości stężeń racemicznego AC (a) oraz DC (b) w stanie stacjonarnym, jako funkcja czasu, oznaczanych w osoczu badanych chorych, po podaniu różnych dawek leku.



*Rycina 35. Zależność średnich wartości stężeń racemicznego AC (a) oraz DC (b), w stanie stacjonarnym, jako funkcja czasu, oznaczanych w pełnej krwi badanych chorych, po podaniu różnych dawek leku.*

W tabeli 32 zebrano średnie wartości stosunku stężeń DC do AC wyznaczone w osoczu badanych chorych, po różnych czasach od chwili podania ostatniej dawki leku.

Analogiczne wyniki badań otrzymane u tych samych chorych w pełnej krwi przedstawiono w tabeli 33.

**Tabela 32.** Średnie wartości stosunku stężeń DC do AC wyznaczone w osoczu chorych, po różnych czasach, w zależności od dawki leku.

Dawka [mg/dobę]	n	Stosunek stężeń DC/AC w czasie [h]				
		*	1	2	4	8
2 x 100 mg	8	5.92±5.80	1.83±0.90	1.65±0.67	2.46±2.40	5.66±6.60
200mg +100mg	3	3.56±0.74	1.16±0.37	2.18±1.76	1.94±0.56	3.25±1.38
2 x 200 mg	6	3.10±1.10	0.76±0.16	1.32±0.26	1.58±0.44	2.26±0.54
1 x 400 mg	7	12.9±6.03	1.28±0.44	1.37±0.53	2.31±0.36	4.94±1.08

\* czas przed podaniem kolejnej dawki leku,

n - liczba chorych,

**Tabela 33.** Średnie wartości stosunku stężeń DC do AC wyznaczone w pełnej krwi chorych, po różnych czasach, w zależności od dawki leku.

Dawka [mg/dobę]	n	Stosunek stężeń DC/AC w czasie [h]				
		*	1	2	4	8
2 x 100 mg	8	5.29±2.37	1.80±1,03	1.74±0.83	2.72±2.05	5.31±1.73
200mg +100 mg	3	4.05±0.30	1.05±0.36	1.29±0.32	1.99±0.39	3.26±0.17
2 x 200 mg	6	3.17±0.91	0.79±0.13	1.28±0.28	1.72±0.41	2.72±0.72
1 x 400mg	7	11.26±4.2	1.18±0.55	1.57±0.39	2.43±0.50	4.67±1.15

\* czas przed podaniem kolejnej dawki leku,

n - liczba chorych.



W tabelach 34 i 35 zebrano średnie wartości parametrów farmakokinetycznych obliczonych dla acebutololu i diacetololu na podstawie ich stężeń oznaczanych metodą achiralną odpowiednio w osoczu i pełnej krwi, po podaniu różnych dawek leku.

**Tabela 34.** Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych AC i DC obliczone na podstawie stężeń oznaczonych metodą achiralną w osoczu badanej grupy chorych.

Dawka [mg/dobę]	2 x 100 mg		200 mg + 100 mg		2 x 200 mg		1 x 400 mg	
Parametr	AC	DC	AC	DC	AC	DC	AC	DC
$C_{max}$ [ng/mL]	205.8 ±123.4	314.9 ±162.0	412.7 ±58.4	448.2 ±207.0	570.3 ±140.9	492.8 ±105.6	927.1 ±325	1116 ±397
$t_{max}$ [h]	2.38 ±1.41	2.50 ±1.31	1.67 ±0.58	1.67 ±0.58	1.33 ±0.52	2.83 ±1.33	2.29 ±1.25	3.14 ±1.07
AUC [ng·h·mL <sup>-1</sup> ]	1275 ±1008	2474 ±1370	2132 ±325	3622 ±1593	2370 ±794	4130 ±1142	3910 ±1686	8744 ±2535
$K_e$ [h <sup>-1</sup> ]	0.20 ±0.11	0.12 ±0.08	0.24 ±0.06	0.13 ±0.10	0.25 ±0.06	0.14 ±0.08	0.26 ±0.07	0.16 ±0.05
$t_{0.5}$ [h]	3.63 ±1.70	5.64 ±0.45	2.84 ±0.42	5.12 ±1.95	2.90 ±0.70	4.82 ±0.90	2.85 ±0.44	4.78 ±2.14

**Tabela 35.** Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych AC i DC obliczone na podstawie stężeń oznaczonych metodą achiralną w pełnej krwi badanych chorych.

Dawka [mg/dobę]	2 x 100 mg		200 mg + 100 mg		2 x 200 mg		1 x 400 mg	
Parametr	AC	DC	AC	DC	AC	DC	AC	DC
$C_{max}$ [ng/mL]	272.8 ±181	396.9 ±155	493.3 ±91.4	573.4 ±86.2	616.1 ±143	584.4 ±116	970.4 ±832.4	1323 ±453
$t_{max}$ [h]	2.10 ±1.30	2.25 ±1.50	1.70 ±0.58	2.0 ±0.65	1.20 ±0.40	2.33 ±0.80	2.25 ±1.17	3.50 ±0.93
AUC [ng·h·mL <sup>-1</sup> ]	1683 ±1333	3353 ±1329	2806 ±816	4534 ±330	3044 ±400	5155 ±911	4494 ±1156	10696 ±3775
$K_e$ [h <sup>-1</sup> ]	0.21 ±0.11	0.11 ±0.09	0.30 ±0.12	0.15 ±0.03	0.23 ±0.08	0.17 ±0.10	0.27 ±0.06	0.17 ±0.06
$t_{0.5}$ [h]	3.35 ±1.27	5.95 ±1.03	2.61 ±0.83	4.71 ±0.90	3.31 ±1.13	4.63 ±3.36	2.95 ±0.35	4.17 ±1.25

Z otrzymanych danych wynika, że biologiczny okres półtrwania DC osiągał wyższe wartości w porównaniu z lekiem macierzystym, a obserwowane różnice były istotne statystycznie, zarówno dla osocza, jak i pełnej krwi ( $p = 0.02$  oraz  $p = 0.04$ ). Podobne zależności obserwowano dla pól pod krzywymi stężenie – czas (AUC), które w przypadku badanego metabolitu były znacznie większe niż dla acebutololu ( $p = 0.02$  oraz  $p = 0.03$  odpowiednio dla oznaczeń wykonanych w osoczu oraz pełnej krwi).

Otrzymane wyniki wykazały, że biologiczne okresy półtrwania zarówno AC, jak i DC nie zależały od wielkości podawanych dawek, co świadczy o liniowości procesu eliminacji tych związków w zakresie stosowanego dawkowania.

Obserwowane stężenia zarówno leku macierzystego, jak i aktywnego farmakologicznie metabolitu były wyższe w pełnej krwi niż w osoczu (stosunki stężeń maksymalnych AC i DC w pełnej krwi do osocza wahały się pomiędzy 1.05 a 1.33).

## ***8.2. Ocena farmakokinetyki enancjomerów AC oraz DC u chorych na podstawie stężeń oznaczanych metodą chiralną***

W tabeli 36 zebrano dane demograficzne 14 chorych (9 kobiet i 5 mężczyzn) leczonych acebutololem u których oznaczano stężenia stacjonarne enancjomerów AC i DC w osoczu oraz pełnej krwi z zastosowaniem opracowanych enancjoselektywnych metod oznaczania tych związków.

*Tabela 36. Dane demograficzne chorych leczonych acebutololem.*

L.p.	Płeć	Wiek [lata]	Waga [kg]	Wzrost [cm]	Klirens kreatyniny [mL/min]
1	k	45	65	156	111.12
2	m	42	81	178	88.59
3	m	61	78	166	78.90
4	k	54	55	152	75.25
5	k	49	71	175	91.15
6	k	60	74	156	82.91
7	k	44	75	150	85.09
8	k	39	73	165	98.18
9	k	45	93	167	122.50
10	k	46	63	166	80.82
11	m	38	65	184	83.06
12	m	33	82	170	109.22
13	m	56	90	178	92.23
14	k	39	100	159	98.45

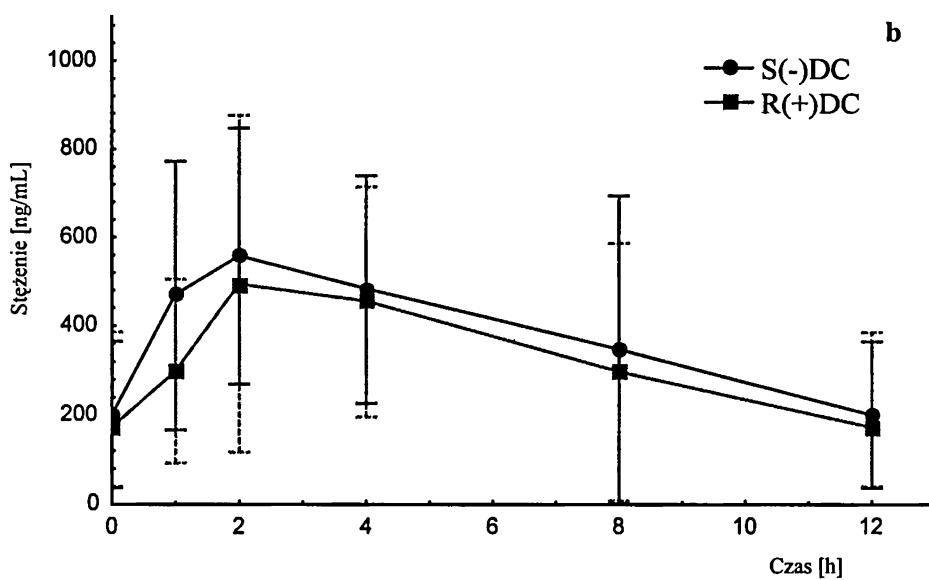
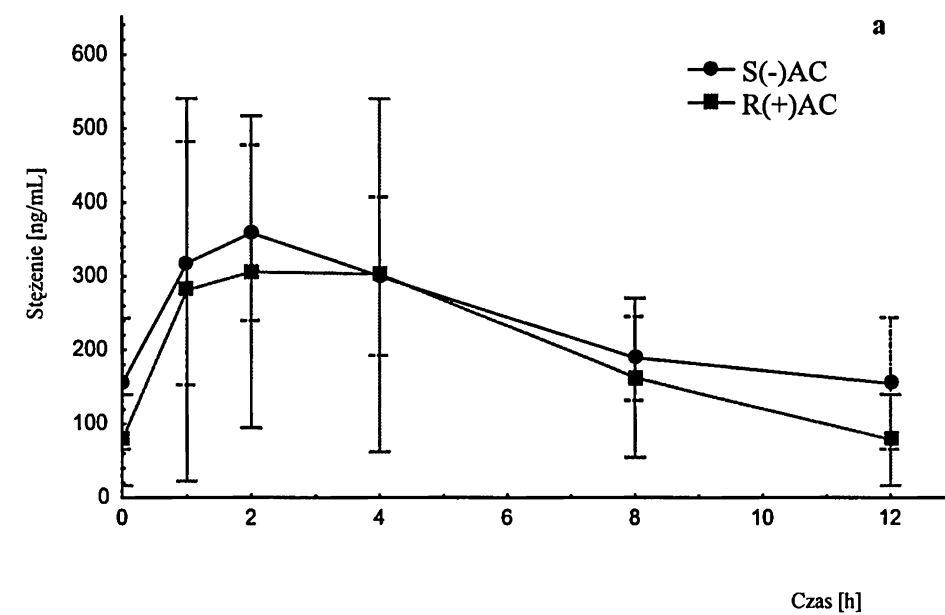
U chorych od 1 do 5 oznaczano w osoczu i pełnej krwi tylko stężenia minimalne ( $C_{\min}$ ) oraz maksymalne ( $C_{\max}$ ) badanych enancjomerów w stanie stacjonarnym, stosując do tego celu odpowiednio metodę pośrednią i bezpośrednią z detekcją UV-VIS lub spektrofluorymetryczną.

Wartości stężeń minimalnych ( $C_{\min}$ ) zostały uwzględnione na rycinach 31, 32 i 33 na których porównywano wszystkie opracowane metody enancjoselektywnego oznaczania tych związków.

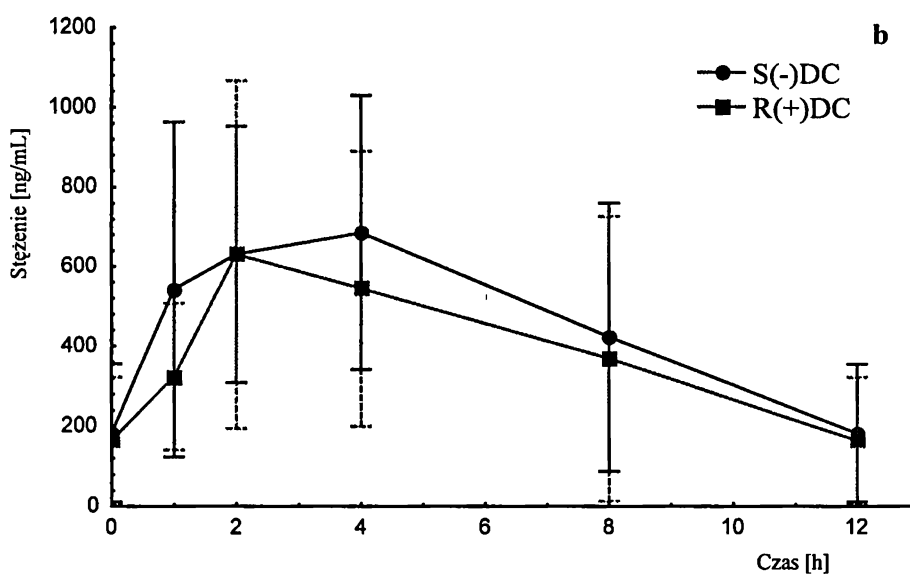
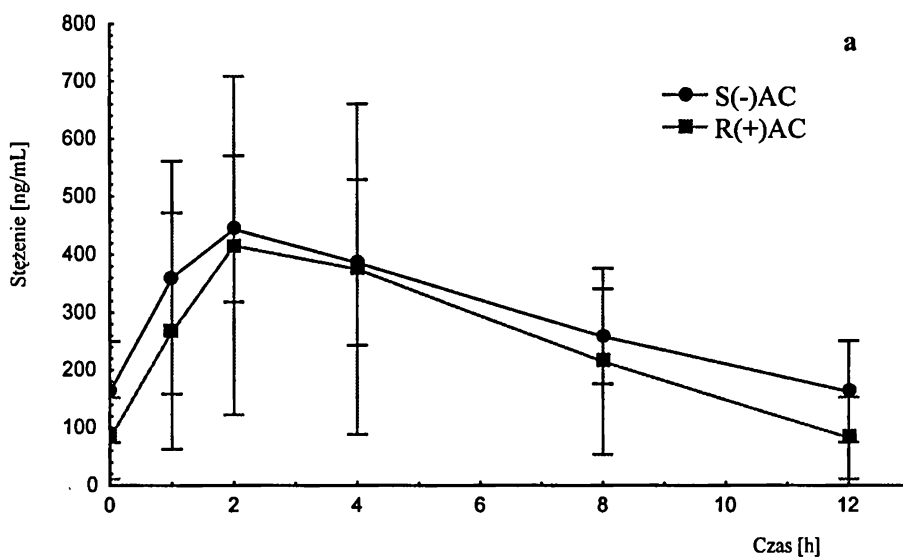
Pełną analizę farmakokinetyki enancjomerów AC i DC przeprowadzano na podstawie ich stężeń oznaczanych metodą bezpośrednią z zastosowaniem detekcji UV-VIS, w osoczu i pełnej krwi 9 chorych, którym podawano lek macierzysty w dawce 2 x 200 mg (chorzy 6 – 14, tabela 36).

Na rycinie 36 przedstawiono wykresy zależności średnich wartości stężeń stacjonarnych enancjomerów S(-)AC i R(+)-AC oraz S(-)DC i R(+)-DC, jako funkcja czasu, oznaczonych w osoczu badanych chorych.

Analogiczne wykresy zależności średnich wartości stężeń stacjonarnych enancjomerów S(-)AC i R(+)-AC oraz S(-)DC i R(+)-DC jako funkcja czasu, oznaczonych w pełnej krwi tych chorych przedstawiono na rycinie 37.



**Rycina 36.** Zależność średnich wartości stężeń stacjonarnych enancjomerów *S(-)AC* i *R(+)-AC* (a) oraz *S(-)DC* i *R(+)-DC* (b) jako funkcja czasu oznaczanych w osoczu badanych chorych, ( $n=9$ ).



**Rycina 37.** Zależność średnich wartości stężeń stacjonarnych enancjomerów *S(-)AC* i *R(+)-AC* (a) oraz *S(-)DC* i *R(+)-DC* (b) jako funkcja czasu oznaczanych w pełnej krwi badanych chorych, ( $n=9$ ).

W tabelach 37 i 38 zebrano średnie wartości parametrów farmakokinetycznych badanych enancjomerów, obliczone na podstawie ich stężeń oznaczanych odpowiednio w osoczu oraz pełnej krwi badanych chorych.

**Tabela 37.** Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych enancjomerów AC i DC obliczone na podstawie stężeń oznaczanych metodą chiralną w osoczu badanych chorych.

Związek	$C_{\max}$ [ng/mL]	$t_{\max}$ [h]	$K_e$ [ $h^{-1}$ ]	$t_{0.5}$ [h]	$AUC_{0 \rightarrow 12}$ [ng·h·mL $^{-1}$ ]
S(-)AC	424.4±135.6	2.11±1.17	0.224±0.04	3.36±0.16	6192.2±2775.5
R(+)-AC	463.2±227.6	2.56±1.42	0.219±0.01	3.18±0.20	3774.2±2493.8
S(-)DC	731.3±265.8	2.22±1.09	0.160±0.02	4.39±0.63	4730.1±2680.4
R(+)-DC	574.4±355.9	2.33±1.02	0.242±0.02	2.88±0.22	4364.3±2041.1

**Tabela 38.** Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych enancjomerów AC i DC obliczone na podstawie stężeń oznaczanych metodą chiralną w pełnej krwi badanych chorych.

Związek	$C_{\max}$ [ng/mL]	$t_{\max}$ [h]	$K_e$ [ $h^{-1}$ ]	$t_{0.5}$ [h]	$AUC_{0 \rightarrow 12}$ [ng·h·mL $^{-1}$ ]
S(-)AC	519.1±161.5	2.22±1.09	0.208±0.01	3.34±0.21	6643.4±3237.6
R(+)-AC	530.7±256.2	2.67±1.32	0.235±0.02	2.95±0.19	4843.2±6122.4
S(-)DC	885.8±343.3	2.44±1.24	0.160±0.03	4.47±0.94	5300.4±1715.1
R(+)-DC	670.6±413.3	2.22±1.09	0.251±0.05	2.82±0.52	4762.9±2688.2

Z otrzymanych wartości wynika, że zarówno w osoczu, jak i pełnej krwi eliminacja enancjomeru S(-)DC zachodziła wolniej w porównaniu do antypody R(+)-DC. Obserwowane różnice biologicznego okresu półtrwania dla enancjomerów DC były znamienne statystycznie, ( $p = 0.03$  oraz  $p = 0.04$  odpowiednio dla oznaczeń wykonanych w osoczu oraz pełnej krwi).

Z porównania pól pod krzywymi stężenie – czas (AUC) wynika, że wartości tych pól były większe dla enancjomerów o konfiguracji S(-)AC, jak i S(-)DC w porównaniu do enancjomerów R(+)-AC oraz R(+)-DC, lecz obserwowane różnice nie były istotne statystycznie ( $p = 0.15$  i  $0.77$  dla oznaczeń wykonanych w osoczu oraz  $p = 0.14$  i  $0.55$  dla oznaczeń wykonanych w pełnej krwi).

### **8.3. Analiza wiązania racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów z erytrocytami**

#### **8.3.1. Ocena wiązania w warunkach in vivo**

W tabeli 39 zebrano średnie wartości stopnia wiązania ( $f$ ) racemicznego acebutololu i jego metabolitu diacetololu z erytrocytami wyznaczone w warunkach in vivo w różnych czasach od chwili podania określonej dawki leku macierzystego.

W tabeli 40 zebrano średnie wartości współczynników podziału erytrocyty/osocze ( $K_{E/O}$ ) obliczone dla leku macierzystego i jego metabolitu.

Analogiczne wyniki dotyczące procentu wiązania enancjomerów AC i DC w warunkach in vivo u chorych leczonych acebutololem w dawce  $2 \times 200$  mg przedstawiono w tabeli 41, natomiast średnie wartości współczynników podziału pomiędzy erytrocyty i osocze badanych enancjomerów w tabeli 42.

Badanie wiązania racemicznego AC i DC z erytrocytami przeprowadzone w warunkach in vivo nie wykazało znamiennej statystycznej różnicy pomiędzy wiązaniem tych związków ( $p = 0.25$ ). Nie wykazano również wpływu dawkowania leku macierzystego na procent tego wiązania ( $p = 0.18$ ).

Analiza statystyczna otrzymanych wyników nie wykazała istnienia różnic znamienych statystycznie pomiędzy współczynnikami podziału erytrocyty / osocze dla racemicznego AC i DC ( $p = 0.12$ ).

Szybka równowaga dystrybucyjna leku macierzystego i jego metabolitu pomiędzy erytrocyty i osocze powodowała, że wartości  $K_{E/O}$  nie zmieniały się w czasie ( $p = 0.22$ ).

**Tabela 39.** Procent wiązania (*f*) racemicznego AC i DC z erytrocytami obliczony dla badanej grupy chorych, w różnych czasach.

Procent wiązania w czasie [h]						
Dawka [mg/dobę]	n	Związek	*	1	4	8
2 x 100 mg	8	AC	52.2±19.6	53.2±7.60	52.3±8.90	52.6±12.9
		DC	50.4±10.7	54.5±11.3	50.6±11.0	53.7±12.4
2 x 200 mg	6	AC	50.6±3.64	49.7±7.30	48.1±11.5	48.2±12.5
		DC	51.9±17.1	48.3±12.2	52.6±9.34	50.9±5.80
1 x 400 mg	7	AC	51.5±11.4	49.6±12.9	50.8±4.40	52.2±7.51
		DC	51.5±8.80	49.4±6.60	51.1±6.52	49.6±6.02

\* czas przed podaniem kolejnej dawki leku,

n – liczba chorych,

**Tabela 40.** Współczynnik podziału erytrocyty/osocze ( $K_{E/O}$ ) dla racemicznego AC oraz DC obliczony w warunkach *in vivo*.

Współczynnik podziału erytrocyty/osocze w czasie [h]						
Dawka [mg/dobę]	n	Związek	*	1	4	8
2x100 mg	8	AC	0.890±0.02	0.880±0.06	1.020±0.04	1.040±0.08
		DC	0.990±0.01	0.890±0.06	1.010±0.06	1.030±0.07
2 x 200 mg	6	AC	0.970±0.03	0.990±0.04	1.021±0.03	1.050±0.03
		DC	1.070±0.05	0.890±0.03	1.011±0.02	1.010±0.04
1 x 400 mg	7	AC	1.062±0.04	1.025±0.02	1.001±0.03	1.015±0.05
		DC	1.066±0.06	1.020±0.04	1.013±0.03	1.010±0.05

\* czas przed podaniem kolejnej dawki leku,

n – liczba chorych,



**Tabela 41.** Procent wiązania (f) enancjomerów AC oraz DC z erytrocytami, obliczony dla warunków *in vivo*.

Procent wiązania w czasie [h]						
Dawka [mg/dobę]	n	Związek	*	1	4	8
2 x 200 mg	9	S(-)AC	49.8±2.33	48.8±1.85	50.3±2.44	50.6±2.13
		R(+ )AC	48.5±2.60	48.7±2.70	50.1±2.58	51.1±2.31
		S(-)DC	48.6±2.13	49.4±2.25	50.5±2.38	49.6±2.75
		R(+ )DC	49.7±3.09	50.2±3.44	50.1±2.58	50.3±3.06

\* czas przed podaniem kolejnej dawki leku,

n – liczba chorych.

Podobna analiza statystyczna dotycząca wiązania enancjomerów AC i DC z erytrocytami nie wykazała różnic istotnych statystycznie zarówno pomiędzy wiązaniem formy S(-)AC i R(+ )AC, ( $p = 0.08$ ), jak i formy S(-)DC i R(+ )DC, ( $p = 0.09$ ). Procent tego wiązania nie zmieniał się w badanym przedziale czasu ( $p = 0.32$  oraz  $p = 0.44$  odpowiednio dla enancjomerów AC oraz DC).

**Tabela 42.** Współczynnik podziału erytrocyty/osocze ( $K_{E/O}$ ) dla enancjomerów AC oraz DC obliczony w warunkach *in vivo*.

Współczynnik podziału erytrocyty/osocze w czasie [h]						
Dawka [mg/dobę]	n	Związek	*	1	4	8
2 x 200 mg	9	S(-)AC	1.006±0.05	0.983±0.08	1.012±0.11	1.011±0.09
		R(+ )AC	1.021±0.08	0.998±0.06	0.975±0.01	0.972±0.06
		S(-)DC	1.004±0.03	0.981±0.06	1.002±0.08	1.052±0.07
		R(+ )DC	1.001±0.06	0.948±0.04	0.915±0.03	0.961±0.04

\* czas przed podaniem kolejnej dawki leku,

n – liczba chorych.

Ocena statystyczna współczynnika podziału dla enancjomerów AC oraz DC pomiędzy erytrocyty a osocze nie wykazywała różnic znamienych

statystycznie, ( $p = 0.92$  oraz  $0.88$  odpowiednio dla enancjomerów AC i DC). Podobnie, jak w przypadku postaci racemicznych AC oraz DC wartość tego współczynnika dla badanych enancjomerów nie zależała od czasu ( $p = 0.52$  oraz  $0.45$  odpowiednio dla enancjomerów AC i DC).

#### 8.4.2. Ocena wiązania w warunkach in vitro

Przeprowadzone badania w warunkach in vivo potwierdzono badaniem wiązania AC i DC oraz ich enancjomerów w warunkach in vitro.

W tabeli 43 zebrano średnie wartości wiązania racemicznego AC oraz DC z erytrocytami, w zależności od stężenia leku i jego metabolitu, natomiast wartości współczynnika podziału pomiędzy erytrocyty a osocze, wyznaczone dla tych związków przedstawiono w tabeli 44.

**Tabela 43.** Procent wiązania ( $f$ ) z erytrocytami dla racemicznego AC i DC, w zależności od stężenia związku, ( $n=6$ ).

Stężenie [ng/mL]	Procent wiązania dla AC i DC			
	50	100	500	1000
$f_{AC}$	50.10±3.26	50.30±4.27	51.66±3.01	49.93±2.53
$f_{DC}$	51.70±1.92	51.21±2.70	52.33±2.50	51.51±3.13

**Tabela 44.** Współczynnik podziału erytrocyty/osocze ( $K_{E/O}$ ) dla racemicznego AC i DC, w zależności od stężenia związku, ( $n=6$ ).

Stężenie [ng/mL]	Współczynnik podziału dla AC i DC			
	50	100	500	1000
$K_{E/O}$ dla AC	1.004±0.08	0.990±0.06	1.013±0.12	1.011±0.11
$K_{E/O}$ dla DC	1.011±0.11	0.948±0.07	0.951±0.05	0.977±0.06

Z otrzymanych danych wynika, że zarówno AC, jak i DC podobnie, jak w badaniach przeprowadzonych w warunkach *in vivo* wiążą się z erytrocytami w około 50 %. Procent tego wiązania pomiędzy AC i DC nie różnił się istotnie statystycznie ( $p = 0.23$ ) oraz nie zależał od stężenia badanych związków ( $p = 0.89$ ), co świadczy o jego liniowości w zakresie badanych stężeń (50 – 1000 ng/mL).

Z analizy współczynnika podziału  $K_{E/O}$  wynika, że AC w takim samym stopniu wiąże się z erytrocytami jak DC ( $p = 0.33$ ). Wartość tego współczynnika podobnie jak w badaniach *in vivo* nie zależała od stężenia całkowitego badanych związków ( $p = 0.18$ ).

Podobne zależności dla enancjomerów AC i DC wyznaczone w warunkach *in vitro* zebrano w tabelach 45 oraz 46.

**Tabela 45.** Procent wiązania ( $f$ ) enancjomerów AC oraz DC z erytrocytami, w zależności od stężenia tych enancjomerów, ( $n=7$ ).

Procent wiązania dla enancjomerów AC i DC				
Stężenie [ng/mL]	5	50	250	500
$f_{S(-)AC}$	51.83±4.07	50.84±1.80	51.42±1.80	51.63±2.46
$f_{R(+ )AC}$	50.47±0.16	51.50±3.42	51.96±1.81	50.57±2.68
$f_{S(-)DC}$	51.04±3.20	51.08±3.20	49.91±3.0	49.66±2.62
$f_{R(+ )DC}$	51.45±3.18	50.97±4.16	49.32±3.46	49.42±2.05

**Tabela 46.** Współczynnik podziału erytrocyty/osocze ( $K_{E/O}$ ) dla enancjomerów AC oraz DC, w zależności od stężenia tych enancjomerów, ( $n=6$ ).

Stężenie [ng/mL]	Współczynnik podziału dla enancjomerów AC i DC			
	5	50	250	500
$K_{S(-)AC}$	1.056±0.01	0.942±0.04	1.030±0.05	0.972±0.05
$K_{R(+ )AC}$	0.965±0.01	0.965±0.08	1.005±0.05	0.969±0.08
$K_{S(-)DC}$	0.961±0.04	0.923±0.03	0.963±0.07	0.919±0.07
$K_{R(+ )DC}$	1.034±0.02	0.938±0.04	1.004±0.05	0.979±0.07

Z analizy otrzymanych danych wynika, że podobnie jak w warunkach *in vivo* proces wiązania i dystrybucji enancjomerów AC i DC pomiędzy osocze i erytrocyty nie ma charakteru enancjoselektywnego. Stała wartość procentu związanego każdego z badanych enancjomerów wskazuje, że w badanym zakresie stężeń proces ten jest liniowy.

## 9. Dyskusja wyników

Warunkiem rzetelnej oceny farmakokinetyki leku jest dysponowanie odpowiednią metodą analityczną spełniającą kryteria walidacji wg procedur przyjętych w ramach dobrej praktyki laboratoryjnej.

Wymagania stawiane tym metodom stosowanym na obszarze farmakokinetyki klinicznej są szczególnie duże, ponieważ wykorzystywane są one na ogół do analizy próbek o małej objętości, zawierających nie tylko związki endogenne pochodzące z matrycy biologicznej ale także aktywne metabolity oraz bardzo często inne równocześnie podawane leki [19].

Ponadto takie czynniki jak: złożoność i pracochłonność prowadzonych czynności związanych z przygotowaniem próbek, a także czas trwania samej analizy i jej koszty będą decydowały o przydatności danej metody analitycznej do badań w warunkach klinicznych.

W ramach niniejszej pracy przygotowano metody analityczne pozwalające na oznaczanie stężeń racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów w materiale biologicznym, którym było osocze krwi, pełna krew oraz zawiesina erytrocytów.

Celem oznaczania stężeń racemicznego AC oraz DC opracowano prostą metodę z zastosowaniem HPLC w układzie izokratycznym, z detekcją UV-VIS, którą poprzedzał jednostopniowy proces ekstrakcji badanych związków z matrycy biologicznej. Wydajność tego procesu ze wszystkich analizowanych matryc dla leku macierzystego oraz metabolitu mieściła się w zakresie od  $80.41 \pm 7.08$  do  $89.38 \pm 3.42\%$ .

Opracowane warunki analizy chromatograficznej pozwoliły na selektywne i specyficzne oznaczanie AC oraz DC, gdyż nie stwierdzono interferencji ze strony substancji endogennych, jak również metabolitów oraz równocześnie podawanych innych leków.

Omówione w części teoretycznej parametry rozdziału chromatograficznego wyznaczone dla racemicznego AC i DC, takie jak: współczynnik pojemnościowy ( $k$ ), współczynnik rozdzielania ( $\alpha$ ) i zdolność rozdzielcza ( $R_s$ ) mieściły się w zakresach przyjętych jako kryterium poprawnego rozdziału [80] i wynosiły odpowiednio: 2.2 – 12.3; 4.3 - 5.4; 21.9 – 22.3.

Otrzymano liniową zależność krzywych wzorcowych w zakresie badanych stężeń AC i DC, współczynniki korelacji wahały się od 0.989 do 0.999 odpowiednio dla osocza, pełnej krwi oraz erytrocytów.

Wykazano, że omawiana metoda charakteryzuje się niską wartością LOD, która wynosiła 5 ng/mL dla obydwu badanych związków oraz niską granicą oznaczalności, wartość LOQ wahała się pomiędzy  $8.9 \pm 0.2$  ng/mL a  $10.4 \pm 0.9$  ng/mL zarówno dla AC, jak i DC. Podobną wartość LOQ otrzymano w pracy autorów Guentert T. i wsp. [51].

Precyzja i dokładność metody określone w ciągu dnia i w różnych dniach, dla oznaczeń wykonanych w osoczu, pełnej krwi oraz erytrocytach spełniały kryteria walidacji, współczynnik zmienności oraz błąd względny nie przekraczały odpowiednio 10 oraz 15 %.

Ocena opracowanej metody oznaczania stężeń racemicznego AC oraz DC wykazała jej przydatność do oznaczania tych związków w warunkach klinicznych. Nie bez znaczenia jest także zadawalający czas trwania analizy, który łącznie z procesem ekstrakcji dla jednej próbki wynosił około 30 minut.

Badanie farmakokinetyki leków chiralnych w oparciu o pomiar ich stężeń postaci racemicznej w przypadku enancjoselektywnego przebiegu procesów farmakokinetycznych może stwarzać pewne trudności i prowadzić często do błędnych decyzji, związanych z dawkowaniem tych leków oraz oceną zależności stężenie – efekt. Dlatego też w niniejszej pracy opracowano dwie metody analityczne pozwalające na oznaczanie stężeń enancjomerów zarówno leku macierzystego, jak i jego metabolitu w materiale biologicznym (osocze krwi, pełna krew, zawiesina erytrocytów).

Pierwsza z nich to metoda pośrednia z detekcją UV-VIS, druga to metoda bezpośrednia z detekcją UV-VIS lub spektrofluorymetryczną.

Enancjoselektywna analiza stężeń AC i DC metodą pośrednią związana była z upochadnianiem tych związków odczynnikiem S(+)-NEIC. W doborze tego odczynnika kierowano się pracą Piquette-Miller i wsp. [101, 102].

Do rozdziału poszczególnych enancjomerów wykorzystano zaproponowany przez wymienionych autorów skład fazy ruchomej, dokonując

jedynie niewielkich modyfikacji stosunków objętościowych poszczególnych składników tej fazy.

Wyniki badań dotyczące jakości rozdzielania chromatograficznego badanych enancjomerów wykazały optymalne wartości parametrów będących kryterium poprawnego rozdzielania, wynoszące odpowiednio: ( $k$ ) 1.3 – 7.5; ( $\alpha$ ) 1.1 – 1.7; ( $R_s$ ) 8.1 – 8.6.

Wykazano liniową zależność krzywych wzorcowych dla poszczególnych enancjomerów w zakresie stężeń od 25 do 500 ng/mL, cechujące się wysokimi wartościami współczynników korelacji, które wahały się od 0.994 do 0.999.

Wartość dolnej granicy wykrywalności badanych enancjomerów wynosiła odpowiednio 5 ng/mL dla enancjomerów AC oraz 10 ng/mL dla enancjomerów DC, oznaczanych zarówno w osoczu, jak i pełnej krwi.

Wartość dolnej granicy oznaczalności wahała się natomiast pomiędzy  $23.0 \pm 0.66$  a  $28.65 \pm 1.80$  zarówno dla enancjomerów AC, jak i DC.

Ponieważ w niniejszej pracy zastosowano detekcję UV-VIS, wartości LOQ dla poszczególnych enancjomerów były niższe od uzyskanych w pracy autorów Piquette-Miller M. i wsp. [101, 102] w której zastosowano detektor spektrofluorymetryczny.

Opracowane warunki analizy zapewniały zadawalającą precyzję i dokładność pomiarów. Współczynnik zmienności i błąd względny nie przekraczały wartości wynoszących odpowiednio 10 i 15 %.

Pomiar stężeń enancjomerów AC i DC dokonany za pomocą tej metody potwierdził wysoki odzysk procesu ekstrakcji wynoszący 73 – 89 % dla enancjomerów AC oraz 76 – 91 % dla enancjomerów DC.

Z przeprowadzonych badań wynika, że opracowana metoda pośredniego rozdzielania enancjomerów AC i DC może być stosowana do oznaczania stężeń enancjomerów tych związków celem charakterystyki ich profilu farmakokinetycznego u ludzi.

Drugą z opracowanych metod enancjoselektywnego oznaczania stężeń AC i DC stanowiła metoda bezpośrednia z detekcją UV-VIS lub spektrofluorymetryczną.

W metodzie tej rozdział badanych związków przeprowadzono bezpośrednio na kolumnie chiralnej. Modyfikując skład fazy ruchomej podany przez producenta kolumny otrzymano fazę stanowiącą mieszaninę heksanu i etanolu w stosunku 91:9 v/v, z dodatkiem 1 mL dietyloaminy.

Analizę próbek podobnie jak w poprzednio omówionych dwóch metodach poprzedzono procesem jednostopniowej ekstrakcji. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły wysoką wydajność tego procesu niezależnie od stosowanego detektora oraz matrycy biologicznej, mieszczącej się w granicach 75 – 89 %.

W ustalonych warunkach analitycznych uzyskano zadawalający rozdział badanych związków, nie stwierdzono interferencji ze strony endogennych substancji zawartych w badanych matrycach biologicznych oraz innych równocześnie podawanych leków.

Parametry charakteryzujące jakość rozdziału chromatograficznego badanych enancjomerów przyjmowały wartości optymalne, tzn.  $k > 2$ ,  $\alpha > 1$  oraz  $R_s > 2$ . Precyzja i dokładność tych metod były porównywalne, tzn. wartość CV dla niskich i wysokich stężeń była niższa odpowiednio od 20 % i 10 %, natomiast błąd względny dla wszystkich oznaczeń nie przekraczał 15 %.

Jedynym czynnikiem różnicującym omawiane metody bezpośredniego oznaczania enancjomerów AC i DC z detekcją UV-VIS lub spektrofluorymetryczną była wartość LOD oraz LOQ. Detekcja spektrofluorymetryczna cechowała się znacznie niższą wartością LOD oraz LOQ w porównaniu do detekcji UV-VIS. Wartość LOD w przypadku detekcji spektrofluorymetrycznej wynosiła 1 ng/mL zarówno dla enancjomerów AC, jak i DC, natomiast wartość LOQ wahała się pomiędzy  $4.57 \pm 0.40$  a  $5.56 \pm 0.22$  dla wszystkich badanych enancjomerów.

Przeprowadzone procedury walidacji opracowanych metod analitycznych umożliwiają stosowanie ich w laboratorium klinicznym do rutynowego oznaczania zarówno racemicznego acebutololu i diacetololu oraz ich izomerów optycznych.

Celem porównania opracowanych metod enancjoselektywnego oznaczania AC i DC wykonano analizę stężeń minimalnych w stanie stacjonarnym ( $C_{\min}$ ) w grupie 5 pacjentów, stosując do tego celu wszystkie z opracowanych metod, tzn.



pośrednią z detekcją UV-VIS oraz bezpośrednią, odpowiednio z detekcją UV-VIS lub spektrofluorymetryczną.

Analiza statystyczna wykazała, że opracowane metody analityczne są równoważne, co oznacza z praktycznego punktu widzenia, że stężenia oznaczane za pomocą tych metod pozwalają na obliczanie parametrów farmakokinetycznych nie obciążonych błędem analitycznym.

Niezależnie od tego wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że bezpośredni rozdział enancjomerów z zastosowaniem kolumny chiralnej jest mniej pracochłonny i obciążony mniejszymi błędami. W przypadku metody pośredniej konieczność zastosowania odczynnika upochadniającego stwarza ryzyko jego racemizacji podczas przechowywania, jak również możliwość jego zanieczyszczenia.

W pracy tej dokonano ponadto analizy farmakokinetycznej racemicznego AC i jego aktywnego farmakologicznie metabolitu DC w grupie 24 chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, którym podawano różne dawki leku macierzystego. Dawkowanie to podyktowane było wskazaniami klinicznymi a niektórym chorym podawano także inne leki wspomagające. U chorych tych nie zaobserwowano niewydolności nerek, klirens kreatyniny wahał się pomiędzy 74.56 a 112.55 mL/min. Stężenia stacjonarne tych związków oznaczano w osoczu i pełnej krwi chorych z uwagi na istotne ich wiązanie z erytrocytami.

Dostępne w piśmiennictwie dane oceniają farmakokinetykę racemicznego AC oraz DC po jednorazowym podaniu dożylnym [65, 84, 110], jednorazowym [66, 67] i wielokrotnym [130] podaniu doustnym tego leku, w grupie zdrowych ochotników. Brak jest natomiast danych dotyczących farmakokinetyki tych związków po wielokrotnym podaniu doustnym, chorym z nadciśnieniem tętniczym, u których oznaczano stężenia stacjonarne racemicznego AC i DC.

W prezentowanej pracy wykazano, że stężenia stacjonarne diacetololu są wyższe w porównaniu do stężeń acebutololu, a narastające wartości stosunku stężeń DC/AC w badanym przedziale dawkowania wskazują na kumulację tego metabolitu, w wyniku wolniejszego procesu jego eliminacji.

Wartości okresu półtrwania obliczone dla AC wahały się pomiędzy 2.84 – 3.63 h oraz 2.61 – 3.35 h odpowiednio dla osocza oraz pełnej krwi. Natomiast

dla DC były wyższe i wynosiły 4.78 - 5.64 oraz 4.17 – 5.95 odpowiednio dla badanych matryc biologicznych. Obserwowane różnice były istotne statystycznie.

Wolniejsza eliminacja aktywnego farmakologicznie diacetololu w porównaniu z acebutololem może częściowo wyjaśniać dłuższe działanie leku macierzystego niż wynikałoby to z jego profilu farmakokinetycznego (krótki okres półtrwania acebutololu).

Podobne wyniki prezentowali w swoich pracach Kaye C. i wsp. [66, 67] oraz Winkle R. i wsp. [130].

Dostępne w piśmiennictwie dane opisujące farmakokinetykę enancjomerów acebutololu oraz diacetololu u ludzi pochodzą z pracy autorów Piguette-Miller M. i wsp. [103, 104] oraz Kaila i wsp. [63]. Ocenili oni farmakokinetykę enancjomerów tych związków w grupie zdrowych ochotników, którym podawano doustnie jednorazową dawkę racemicznego acebutololu. Badania ich wykazały stereoselektywną dyspozycję zarówno enancjomerów AC, jak i DC, głównie w procesie ich eliminacji z organizmu.

W niniejszej pracy ocenę farmakokinetyki enancjomerów AC i DC w osoczu oraz pełnej krwi przeprowadzono w grupie 9 chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, którym podawano acebutolol w dawce 2 x 200 mg. U chorych tych nie stwierdzono niewydolności nerek, klirens kreatyniny wahał się pomiędzy 80.82 a 122.50 mL/min.

Obserwowane zarówno w osoczu, jak również pełnej krwi wartości stężeń stacjonarnych enancjomerów S(-)AC oraz S(-)DC były wyższe w porównaniu do stężeń formy R(+ )AC oraz R(+ )DC. Wyniki te znajdowały również odzwierciedlenie w średnich wartościach AUC, gdzie stosunek AUC dla enancjomerów S(-)AC/R(+ )AC wynosił 1.62:1 oraz 1.41:1 odpowiednio dla osocza oraz pełnej krwi. Natomiast stosunek AUC dla enancjomerów metabolitu S(-)DC/ R(+ )DC był równy 1.1:1 oraz 1.17:1 odpowiednio dla osocza oraz pełnej krwi.

Enancjoselektywny charakter dyspozycji diacetololu w organizmie badanych chorych w wyniku którego stężenia enancjomeru S(-)DC były wyższe niż enancjomeru o konfiguracji R(+ ) może stanowić przyczynę

międzyosobniczych różnic w ocenie zależności stężenie - efekt po podaniu leku racemicznego.

Z porównania wartości  $t_{0.5}$  wyznaczonego dla racemicznego AC oraz jego enancjomerów wynika, że wartości tego parametru obliczone zarówno dla osocza, jak i pełnej krwi są zbliżone. Natomiast w przypadku racemicznego DC oraz jego enancjomerów obserwuje się istotne różnice wartości  $t_{0.5}$  pomiędzy enancjomerami S(-)DC oraz R(+)-DC, zarówno w osoczu, jak i pełnej krwi.

Pomimo małej liczebności grupy można przypuszczać, że profil farmakokinetyczny enancjomerów S(-)AC jest zbliżony do profilu związku racemicznego.

Analiza wiązania racemicznego AC oraz DC z erytrocytami przeprowadzona w warunkach *in vivo* wykazała, że wiązanie to mieści się w zakresie 50 % i jest zgodne z wynikami podanymi przez autorów Coombs i wsp. [29]. Ocena statystyczna tych wyników nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy procentem wiązania leku macierzystego i jego metabolitu z erytrocytami.

Współczynnik podziału erytrocyty/osocze dla AC i DC wyznaczony w warunkach *in vivo* nie zmieniał się w czasie, co świadczyło o ustaleniu się równowagi dystrybucyjnej erytrocyty/osocze w badanym przedziale czasu.

Stopień wiązania enancjomerów AC i DC z erytrocytami w tych warunkach, podobnie jak w przypadku związków racemicznych osiągał również wartości rzędu 50 % i nie wykazywał enancjoselektywnego charakteru tego wiązania.

Wartości współczynników podziału pomiędzy erytrocyty/osocze wyznaczone dla enancjomerów AC i DC były również bliskie 1 i nie różniły się pomiędzy sobą istotnie statystycznie.

Potwierdzeniem wyników badań przeprowadzonych w warunkach *in vivo* były badania prowadzone w warunkach *in vitro*. Wyznaczone wartości zarówno procentu wiązania racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów podobnie jak w badaniach *in vivo* były rzędu 50%, a wartości współczynnika podziału tych związków były również bliskie 1 i nie różniły się między sobą znamienne statystycznie.

Badając farmakokinetykę acebutololu w grupie chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym można przypuszczać, pomimo małej liczebności grupy, że w ocenie zależności stężenie – efekt pewną rolę może odgrywać enancjoselektywny charakter dyspozycji aktywnego farmakologicznie metabolitu acebutololu w organizmie badanych chorych.

## 10. Wnioski

1. Achiralna metoda oznaczania stężeń racemicznego acebutololu oraz jego aktywnego farmakologicznie metabolitu diacetololu z zastosowaniem techniki HPLC z detekcją UV-VIS w układzie izokratycznym cechuje się zadawalającymi parametrami rozdziału badanych związków oraz wymaganą dla tego typu oznaczeń precyzją, dokładnością i wykrywalnością.

2. Enancjoselektywne metody oznaczania izomerów optycznych AC i DC z zastosowaniem upochadniania badanych związków (metoda pośrednia z detekcją UV-VIS) oraz wykorzystujące ich rozdzielanie na kolumnie chiralnej (metoda bezpośrednia z detekcją UV-VIS lub spektrofluorymetryczną) pozwoliły na selektywne i specyficzne oznaczanie enancjomerów leku i jego metabolitu w badanych matrycach biologicznych, a przeprowadzona walidacja tych metod umożliwiła ich równocenne zastosowanie w warunkach laboratorium klinicznego.

3. Ocena farmakokinetyki racemicznego acebutololu w grupie chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym na podstawie stężeń oznaczanych zarówno w osoczu, jak i pełnej krwi wskazała na kumulację diacetololu, która może wynikać z wolniejszego procesu eliminacji tego metabolitu.

4. Badanie farmakokinetyki enancjomerów AC i DC przeprowadzone również w grupie pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym może wskazywać na enancjoselektywny proces eliminacji przede wszystkim enancjomerów DC.

5. Wiązanie racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów z erytrocytami przeprowadzone zarówno w warunkach *in vivo*, jak również *in vitro* było liniowe w zakresie stosowanych dawek i badanych stężeń tych związków. Wiązanie enancjomerów AC i DC nie miało charakteru enancjoselektywnego.

6. Wartości współczynników podziału pomiędzy erytrocyty a osocze wyznaczone dla racemicznego AC i DC oraz ich enancjomerów wyznaczone w omawianych warunkach były bliskie 1 i nie różniły się między sobą istotnie statystycznie.

## 11. Piśmiennictwo

1. Abdel – Hamid M.: *Comparative LC – MS and HPLC Analyses of Selected Antiepileptics and Beta – Blocking Drugs*. *Farmaco*. 2000, 55, 136.
2. Aboul-Enein H., Rafiqul Islam M.: *Direct HPLC Separation and Optimization of Celiprolol Enantiomers*. *Anal. Lett.* 1990, 23, 83.
3. Aboul-Enein H., Rafiqul Islam M.: *Direct HPLC Separation of Carazolol Enantiomers on a Cellulose Tris-3,5-dimethylphenyl Carbamate Column*. *Anal. Lett.* 1990, 23, 973.
4. Aboul-Enein H., Rafiqul Islam M.: *Direct Separation and Optimization of Timolol Enantiomers on a Cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate High-Performance Liquid Chromatographic Chiral Stationary Phase*. *J. Chromatogr.* 1990, 511, 109.
5. Aboul-Enein H.: *Applications of Cellulose-Based Chiral Stationary Phases in the Resolution of some Beta-Adrenoceptor Antagonists*. *Anal. Lett.* 1993, 26, 271.
6. Aboul-Enein H., Serignese V.: *Role of Solvents in the Resolution of Some Beta-Adrenergic Blockers on Cellulose Tris-3,5-dimethylphenyl Carbamate Chiral Stationary Phase*. *J. Liq. Chromatogr.* 1993, 16, 197.
7. Aboul-Enein H., Serignese V.: *Direct Enantioselective Separation of Bevantolol by High-Performance Liquid Chromatography on Normal and Reverse Cellulose Chiral Stationary Phases*. *Biomed. Chromatogr.* 1994, 8, 22.
8. Adams A., Stewart J.: *A High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Albuterol Enantiomers in Human Serum Using Solid Phase Extraction and a Sumichiral-OA Chiral Stationary Phase*. *J. Liq. Chromatogr.* 1993, 16, 3863.
9. Adamska-Dyniewska H.: *Miejsce leków beta-adrenolitycznych we współczesnej terapii*. *Probl. Ter. Monit.* 1998, 9, 143.
10. Ariëns E.: *Stereoselectivity in Pharmacodynamics and Pharmacokinetics*. *Schweiz. Med. Wschr.* 1990, 120, 131.
11. Armstrong D., Chen S., Chang C. i wsp.: *A New Approach for the Direct Resolution of Racemic Beta Adrenergic Blocking Agents by HPLC*. *J. Liq. Chromatogr.* 1992, 15, 545.
12. Armstrong D., Hilton M., Coffin L.: *Multimodal Chiral Stationary Phases for Liquid Chromatography: (R)- and (S)-Naphthylethylcarbamate-Derivatized  $\beta$ -Cyclodextrin*. *LC-GC INTL*, 1996, 5.

13. Balmer K., Persson E., Lagerström P. i wsp.: *Liquid Chromatographic Separation of the Enantiomers of Metoprolol and its  $\alpha$ -Hydroxy Metabolite on Chiralcel OD for Determination in Plasma and Urine*. J. Chromatogr. 1991, 553, 391.
14. Barwick V., Ellison S.: *The Evaluation of Measurement Uncertainty from Method Validation Studies. Part 1: Description of a Laboratory Protocol*. Accred Qual Assur. 2000, 5, 47.
15. Bastian G., Urien S., Brée F. i wsp.: *Stereoselective Binding of Tertatolol and of 4-Hydroxytertatolol to Human Plasma Proteins*. Eur. J. Drug Met. Pharmacokinet. 1992, 17, 233.
16. Bojarski J.: *Chromatograficzny rozdział enancjomerów. I. Metody*. Wiad. Chem. 1993, 279.
17. Bojarski J.: *Chromatograficzny rozdział enancjomerów. II. Mechanizmy i zastosowania*. Wiad. Chem. 1993, 419.
18. Borchard U.: *Pharmacokinetics of Beta-Adrenoceptor Blocking Agents: Clinical Significance of Hepatic and/or Renal Clearance*. Clin. Physiol. Biochem. 1990, 8, 28.
19. Bressolle F., Bromet-Petit M., Audran M.: *Validation of Liquid Chromatographic and Gas Chromatographic Methods. Applications to Pharmacokinetics*. J. Chromatogr. B. 1996, 686, 3.
20. Carda – Broch S., Rapado – Martinez I., Esteve – Romero J., i wsp.: *Analysis of Urine Samples Containing Cardiovascular Drugs by Micellar Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection*. J Chromatogr. Sci. 1999, 37, 93.
21. Carr R., Foster R., Bhanji N.: *Stereospecific High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Sotalol in Plasma*. Pharm. Res. 1991, 18, 1195.
22. Ceccato A., Hubert P., Crommen J.: *Direct Liquid Chromatographic Enantioseparation of Sotalol and other  $\beta$ -Blockers using an  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein-Based Chiral Stationary Phase*. J. Chromatogr. A. 1997, 760, 193.
23. Cegła M., Duszyńska B.: *Czy chiralność jest kluczem do stereoselektywnego działania leków*. Post. Hig. Med. Dośw. 1990, 44, 279.
24. Cerqueira P., Cesarino E., Mateus F. i wsp.: *Enantioselectivity in the Steady-State Pharmacokinetics of Metoprolol in Hypertensive Patients*. Chirality, 1999, 11, 591.

25. Chassaing C., Thienpont A., Félix G.: *Regioselective Carbamoylated and Benzoylated Cellulose for the Separation of Enantiomers in High-Performance Liquid Chromatography*. J. Chromatogr. A. 1996, 738, 157.
26. Chien Y., Nair M.: *Biomembrane Permeation and Stereochemistry*. J. Pharm. Sci. 1993, 82, 342.
27. Ching C., Lim B., Lee E.: *Chromatographic Resolution of the Chiral Isomers of Several  $\beta$ -Blockers over Cellulose Tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) Chiral Stationary Phase*. Chirality. 1992, 4, 174.
28. Clausen J., Bickel M.: *Prediction of Drug Distribution in Distribution Dialysis and In Vivo from Binding to Tissues and Blood*. J. Pharm. Sci. 1993, 82, 345.
29. Coombs J., Coulson C., Smith V.: *Blood Plasma Binding of Acebutolol and Diacetolol in Man*. Br. J. Clin. Pharmacol. 1980, 9, 395.
30. Czarnecka I.: *Walidacja metod analitycznych*. Ośrodek Inform. Nauk. Polfa Warszawa, 1995.
31. Davies C.: *Chromatography of  $\beta$ -Adrenergic Blocking Agents*. J. Chromatogr. 1990, 531, 131.
32. Desai D., Gal J.: *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Separation of the Stereoisomers of Labetalol via Derivatization with Chiral and Non-Chiral Isothiocyanate Reagents*. J. Chromatogr. 1992, 579, 165.
33. Donovan K., Gerace R., Dreyer J.: *Acebutolol – Induced Ventricular Tachycardia Reversed with Sodium Bicarbonate*. J. Toxicol. – Clin. Toxicol. 1999, 37, 481.
34. Dyas A.: *The Chiral Chromatographic Separation of  $\beta$ -Adrenoreceptor Blocking Drugs*. J. Pharm. Biomed. Anal. 1992, 10, 383.
35. Ebihara A., Fujimura A.: *Metabolites of Antihypertensive Drugs. An Updated Review of Their Clinical Pharmacokinetics and Therapeutic Implications*. Clin. Pharmacokinet. 1991, 21, 331.
36. Egginger G., Lindner W., Kahr S. i wsp.: *Stereoselective HPLC Bioanalysis of Atenolol Enantiomers in Plasma: Application to a Comparative Human Pharmacokinetic Study*. Chirality. 1993, 5, 505.
37. Ekelund J., van Arkens A., Brønnum-Hansen K. i wsp.: *Chiral Separations of  $\beta$ -Blocking Drug Substances Using Chiral Stationary Phases*. J. Chromatogr. A. 1995, 708, 253.



38. Enquist M., Hermansson J.: *Influence of Uncharged Mobile Phase Additives on Retention and Enantioselectivity of Chiral Drugs using an  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein Column*. J. Chromatogr. 1990, 519, 271.
39. Enquist M., Hermansson J.: *Separation of the Enantiomers of  $\beta$ -Receptor Blocking Agents and other Cationic Drugs Using a CHIRAL-AGP Column. Binding Properties and Characterisation of Immobilised  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein*. J. Chromatogr. 1990, 519, 285.
40. Fell A., Robinson M., Dyas A.: *Influence of the Nature of the Hydrocarbon Solvent on the Separation of Propranolol Enantiomer Derivatives on a Pirkle-type Chiral Stationary Phase*. Analyst. 1991, 116, 1343.
41. Fillet M., Bechet I., Chiap P. i wsp.: *Enantiomeric Purity Determination of Propranolol by Cyclodextrin-modified Capillary Electrophoresis*. J. Chromatogr. A. 1995, 717, 203.
42. Fiset C., Philippon F., Gilbert M. i wsp.: *Stereoselective High-Performance Liquid Chromatographic Assay for the Determination of Sotalol Enantiomers in Biological Fluids*. J. Chromatogr. 1993, 612, 231.
43. Fleurot O., Lecocq B., Lecocq V., i wsp.: *A Comparative Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Conventional and Sustained – Release Preparations of Acebutolol in Healthy Volunteers*. Fundam. Clin. Pharmacol. 1991, 5, 601.
44. Gimenez F., Fernandez C., Baune B. i wsp.: *Chiralité: Implications pharmacocinétiques. 2e partie. Influence de la chiralité sur la pharmacocinétiques des médicaments*. J. Pharm. Clin. 1992, 11, 171.
45. Gourmel B., Fiet J., Collins R. i wsp.: *A Simple Radioimmunoassay of Acebutolol in Plasma*. Clin. Chim. Acta. 1980, 108, 229.
46. Gourmel B., Fiet J., Collins R. i wsp.: *Plasma Diacetolol Assessment by Radioimmunoassay*. Clin. Chim. Acta. 1981. 115. 229.
47. Görög S., Herényi B.:  *$\alpha_1$ -Acid Glycoprotein Column in the High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Some Groups of Chiral Drugs*. J. Pharm. Biomed. Anal. 1990, 8, 837.
48. Grellet J., Michel-Gueroult P., Ducint D. i wsp.: *Sensitive High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Labetalol Diastereoisomers in Plasma Samples without Derivatization*. J. Chromatogr. B. 1994, 652, 59.
49. Gryniewicz G.: *Konsekwencje stereoizomerii syntetycznych substancji leczniczych*. Farm. Pol. 1996, LII, 643.

50. Gübitz G.: *Separation of Drug Enantiomers by HPLC Using Chiral Stationary Phases – A Selective Review*. *Chromatographia*. 1990, 30, 555.
51. Guentert T., Wientjes G., Upton R. i wsp.: *Evaluation of a Modified High-Performance Liquid Chromatography Assay for Acebutolol and its Major Metabolite*. *J. Chromatogr.* 1979, 163, 373.
52. Haginaka J., Seyama Ch., Yasuda H. i wsp.: *Investigation of Enantioselectivity and Enantiomeric Elution Order of Propranolol and its Ester Derivatives on an Ovomucoid-Bonded Column*. *J. Chromatogr.* 1992, 598, 67.
53. Haginaka J., Seyama Ch., Yasuda H. i wsp.: *Retention, Enantioselectivity and Enantiomeric Elution Order of Propranolol and its Ester Derivatives on an Alpha1-Acid Glycoprotein-Bonded Column*. *Chromatographia*. 1992, 33, 127.
54. Haginaka J., Wakai J., Takahashi K. i wsp.: *Chiral Separation of Propranolol and its Ester Derivatives on an Ovomucoid-Bonded Silica: Influence of pH, Ionic Strength and Organic Modifier on Retention, Enantioselectivity and Enantiomeric Elution Order*. *Chromatographia*. 1990, 29, 587.
55. Herring V., Johnson J.: *Direct High-Performance Liquid Chromatographic Determination in Urine of the Enantiomers of Propranolol and its Major Basic Metabolite 4-Hydroxypropranolol*. *J. Chromatogr.* 1993, 612, 215.
56. Hooper W., Baker P.: *Enantioselective Analysis of Sotalol in Plasma by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Using Diastereomeric Derivatives*. *J. Chromatogr. B*. 1995, 672, 89.
57. Horikiri Y., Suzuki T., Mizobe M.: *Pharmacokinetics and Metabolism of Bisoprolol Enantiomers in Humans*. *J. Pharm. Sci.* 1998, 87, 289.
58. Hunt B., Bottorff M., Herring V. i wsp.: *Effects of Calcium Channel Blockers on the Pharmacokinetics of Propranolol Stereoisomers*. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1990, 47, 584.
59. Hurst A., Shotan A., Hoffman K. i wsp.: *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation of Atenolol during and after Pregnancy*. *Pharmacotherapy*. 1998, 18, 840.
60. Huy C., Radenen B., Sahui-Gnassi A., i wsp.: *High-Performance Liquid Chromatographic Determination of (S) – and (R)- Propranolol in Human Plasma and Urine with a Chiral  $\beta$ -Cyclodextrin Bonded Phase*. *J. Chromatogr. B*, 1995, 665, 125.
61. Johnson J., Akers W., Herring V. i wsp.: *Gender Differences in Labetalol Kinetics: Importance of Determining Stereoisomers Kinetics for Racemic Drugs*. *Pharmacotherapy*. 2000, 20, 622.

62. Jira T., Toll C., Vogt C. i wsp.: *Zur Trennung einiger racemischer  $\beta$ -Blocker und  $\alpha$ -Sympathikomimetika durch HPLC nach Derivatisierung*. Pharmazie. 1991, 46, 432.
63. Kaila T., Iisalo E.: *Selectivity of Acebutolol, Atenolol, and Metoprolol in Healthy Volunteers Estimated by the Extent the Drugs Occupy Beta 2 – Receptors in the Circulating Plasma*. J. Clin. Pharmacol. 1993, 33, 959.
64. Kim K., Choi P., Hong S. i wsp.: *Chiral Separation of Beta – Blockers after Derivatization with (-)-Menthyl Chloroformate by Reversed – Phase High Performance Liquid Chromatography*. Arch. Pharm. Res. 1999, 22, 608.
65. Kaye C., Kumana C., Leighton M. i wsp.: *Observations on the pharmacokinetics of acebutolol*. Clin. Pharm. Ther. 1975, 19, 416.
66. Kaye C., Dufton J.: *Preliminary Observations on the Elimination of Acebutolol in Severe Renal Failure*. Br. J. Clin. Pharmacol. 1976, 3, 198.
67. Kaye C., Long A.: *The Influence of pH on the Buccal Absorption and Plasma and Renal Elimination of Acebutolol*. Br. J. Clin. Pharmacol. 1976, 3, 196.
68. Kirkwood F., Adams K.: *Current Perspectives on  $\beta$ -Receptor Antagonists in the Treatment of Symptomatic Ventricular Dysfunction*. Pharmacotherapy 1996, 16, 69S.
69. Kofahl B., Henke D., Mutschler E.: *Direct Enantiospecific HPLC Bioanalysis of (R,S)-Atenolol on a Chiral Stationary Phase*. Chirality. 1993, 5, 479.
70. Kroemer H., Fromm M., Eichelbaum M.: *Stereoselectivity in Drug Metabolism and Action: Effects of Enzyme Inhibition and Induction*. Ther. Drug Monit. 1996, 18, 388.
71. Kunicki P., Sitkiewicz D.: *Wymagania stawiane metodom analitycznym stosowanym w terapii monitorowanej stężeniem leku*. Probl. Ter. Monit. 2000, 11, 80.
72. Laethem M., Belpaire F., Bogaert M.: *Direct High-Performance Liquid Chromatography Determination of Diastereomeric Oxprenolol Glucuronides*. J. Chromatogr. B. 1996, 675, 251.
73. Lalonde R., Tenero D., Burlew B. i wsp.: *Effects of Age on the Protein Binding and Disposition of Propranolol Stereoisomers*. Clin. Pharmacol. Ther. 1990, 47, 447.
74. Lave T., Efthymiopoulos C., Koffel J. i wsp.: *Determination of Tertatolol Enantiomers in Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography*. J. Chromatogr. 1991, 572, 203.

75. Lee C., Porziemsky J., Aubert M. i wsp.: *Liquid and High-Pressure Carbon Dioxide Chromatography of  $\beta$ -Blockers*. J. Chromatogr. 1991, 539, 55.
76. Lennard M., Tucker G., Woods H.: *The Polymorphic Oxidation of  $\beta$ -Adrenoceptor Antagonists. Clinical Pharmacokinetic Considerations*. Clin. Pharmacokinet. 1986, 11, 1.
77. Li F., Cooper S., Côté M.: *Determination of the Enantiomers of Metoprolol and its Major Acidic Metabolite in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection*. J. Chromatogr. B. 1995, 668, 67.
78. Li F., Cooper S., Mikkelsen S.: *Enantioselective Determination of Oxprenolol and its Metabolites in Human Urine by Cyclodextrin-Modified Capillary Zone Electrophoresis*. J. Chromatogr. B. 1995, 674, 277.
79. Lin C., Chang C., Lin W. i wsp.: *Capillary Zone Electrophoretic Separation of  $\beta$ -Blockers Using Citrate Buffer at Low pH*. J. Chromatogr. A. 1996, 753, 133.
80. Linda L., Kumkumian C., Williams R.: *Validation of Chromatographic Methods*. Center Drug Evaluation and Research (CDER). 1994, 3,
81. Lukkari P., Sirén I.: *Ion-Pair Chromatography and Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography in Analysing Beta-Adrenergic Blocking Agents from Human Biological Fluids*. J. Chromatogr. A. 1995, 717, 211.
82. Masood Bhatti M., Foster R.: *Stereospecific High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Metoprolol*. J. Chromatogr. 1992, 579, 361.
83. Meffin P., Harapat S., Harrison D.: *Quantitation in Plasma and Urine of Acebutolol and a Major Metabolite with Preliminary Observations on Their Disposition Kinetics in Man*. Chem. Pathol. Pharmacol. 1976, 15, 31.
84. Meffin P., Winkle R., Peters F. i wsp.: *Acebutolol Disposition after Intravenous Administration*. Clin. Pharm. Ther. 1977, 22, 557.
85. Mehvar R., Jamali F.: *Bioequivalence of Chiral Drugs. Stereospecific versus Non-Stereospecific Methods*. Clin. Pharmacokinet. 1997, 33, 122.
86. Mohammad J., Li Y., El-Ahmad M. i wsp.: *Chiral-Recognition Chromatography of  $\beta$ -Blockers on Continuous Polymer Beds with Immobilised Cellulase as Enantioselective Protein*. Chirality. 1993, 5, 464.
87. Momerency G., Van Cauwenberghe K., Highley M.: *Partitioning of Ifosfamide and its Metabolites between Red Blood Cells and Plasma*. J. Pharm. Sci. 1996, 85, 262.

88. Moniczewski A.: *Erythrocyty-wiązanie i transport leków*. Farm. Pol.. 1997, 53, 345.
89. Morgan D., Guttman A., Watson R. i wsp.: *Effects of Erythrocyte Binding on Elimination of Harmol by the Isolated Perfused Rat Liver*. J. Pharm. Sci. 1996, 85, 40.
90. Morgan T.: *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Carvedilol*. Clin. Pharmacokinet. 1994, 26, 335.
91. Murai-Kushiya M., Okada S., Kimura T. i wsp.: *Stereoselective Binding of Beta-Blockers to Purified Rat Alpha1-Acid Glycoprotein*. J. Pharm. Pharmacol. 1993, 45, 225.
92. Murthy S., Shetty H., Nelson W. i wsp.: *Enantioselective and Diastereoselective Aspects of the Oxidative Metabolism of Metoprolol*. Biochem. Pharmacol. 1990, 40, 1637.
93. Nation R.: *Chirality in New Drug Development. Clinical Pharmacokinetics Considerations*. Clin. Pharmacokinet. 1994, 27, 249.
94. Neugebauer G., Akpan W., Kaufmann B. i wsp.: *Stereoselective Disposition of Carvedilol in Man after Intravenous and Oral Administration of the Racemic Compound*. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1990, 38, 180.
95. Noctor T., Wainer I.: *The in Situ Acetylation of an Immobilised Human Serum Albumin Chiral Stationary Phase for High-Performance Liquid Chromatography in the Examination of Drug-Protein Binding Phenomena*. Pharm. Res. 1992, 9, 480.
96. Oda Y., Asakawa N., Yoshida Y. i wsp.: *Direct-Injection High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Drug Enantiomers in Plasma with an Avidin Column Coupled On-Line to an Ovomucoid Column*. J. Pharm. Sci. 1992, 1227.
97. Ohshima T., Takagi K., Miyamoto K.: *High Performance Liquid Chromatographic Retention Time of  $\beta$ -Blockers as an Index of Pharmacological Activities*. J. Liq. Chromatogr. 1993, 16, 3933.
98. Ohwa M., Akiyoshi M., Mitamura S.: *Chiral Stationary Phase for the Facile Resolution of  $\beta$ -Adrenoceptors Blocking Agents*. J. Chromatogr. 1990, 521, 122.
99. Paradisohardy F., Walker S., Bowles S.: *Steady-state pharmacokinetics of propranolol enantiomers in healthy male volunteers*. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 1998, 7, 370.

100. Petersen P., Ekelund J., Olsen L. i wsp.: *Chiral Separations of  $\beta$ -Blocking Drug Substances Using the Pirkle-Type  $\alpha$ -Burke 1 Chiral Stationary Phase*. J. Chromatogr. A. 1997, 757, 65.
101. Piquette-Miller M., Foster R., Pasutto F. i wsp.: *Stereospecific High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Acebutolol in Human Plasma and Urine*. J. Chromatogr. 1990, 16, 129.
102. Piquette-Miller M., Foster R.: *High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Diacetolol Enantiomers*. J. Chromatogr. 1990, 30, 300.
103. Piquette-Miller M., Foster R., Kappagoda C. i wsp.: *Pharmacokinetics of Acebutolol Enantiomers in Humans*. J. Pharm. Sci. 1991, 80, 313.
104. Piquette-Miller M., Foster R., Kappagoda C. i wsp.: *Effect of Aging on the Pharmacokinetics of Acebutolol Enantiomers*. J. Clin. Pharmacol. 1992, 32, 148.
105. Radevski I., Valtchanova S., Candy G. i wsp.: *Comparison of Acebutolol with and without Hydrochlorothiazide versus Carvedilol with and without Hydrochlorothiazide in Black Patients with Mild to Moderate Systemic Hypertension*. Amer. J. Cardiol. 1999, 84, 70.
106. Rapado-Martinez I., Garcia-Alvarez-Coque M., Villanueva-Camañas R.: *Liquid Chromatographic Procedure for the Evaluation of  $\beta$ -Blockers in Pharmaceuticals Using Hybrid Micellar Mobile Phases*. J. Chromatogr. A. 1997, 765, 221.
107. Rapado-Martinez I., Villanueva-Camañas R., Garcia-Alvarez – Coque M.: *Micellar Liquid Chromatography: A Worthy Technique for the Determination of Beta – Antagonists in Urine Samples*. Anal. Chem. 1999, 71, 319.
108. Rosseel M., Vermeulen A., Belpaire F.: *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Atenolol Enantiomers in Plasma after Chiral Derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl Chloroformate*. J. Chromatogr. 1991, 568, 239.
109. Roux A., Flouvat B., Fouache Y. i wsp.: *Systemic Bioavailability of Acebutolol in man*. Biopharm. Drug. Disp. 1983, 4, 293.
110. Roux A., Flouvat B.: *Pharmacokinetics of Acebutolol after Intravenous Bolus Administration*. Br. J. Clin. Pharmac. 1980, 9, 215.
111. Roux A., Blanchot G., Baglin A. i wsp.: *Liquid Chromatographic Analysis of Propranolol Enantiomers in Human Blood Using Precolumn Derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl Chloroformate*. J. Chromatogr. 1991, 570, 453.

112. Sankey M., Gulaid A., Kaye C.: *Preliminary Study of the Disposition in Man of Acebutolol and its Metabolite, Diacetolol, Using a New Stereoselective HPLC Method.* 1983, 21, 276.
113. Sewell A., Heil M., Podebrad F. i wsp.: *Chiral Compounds in Metabolism: A Look in the Molecular Mirror.* Eur. J. Pediatr. 1998, 157, 185.
114. Shao G., Goto J., Nambara T.: *Separation and Determination of Propranolol Enantiomers in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection.* J. Liq. Chromatogr. 1991, 14, 753.
115. Shimizu T., Hiraoka M., Hakanomyo H.: *Enantioselective Determination of Sotalol Enantiomers in Biological Fluids Using High-Performance Liquid Chromatography.* J. Chromatogr. B. 1995, 674, 77.
116. Simmons B., Stewart J.: *HPLC Determination of Atenolol in Human Serum on Underivatized Silica Using Solid Phase Extraction.* Anal. Lett. 1995, 28, 2017.
117. Siret L., Bargmann N., Tambuté A. i wsp.: *Direct Enantiomeric Separation of  $\beta$ -Blockers on ChyRoSine-A by Supercritical Fluid Chromatography: Supercritical Carbon Dioxide as Transient in Situ Derivatizing Agents.* Chirality. 1999, 4, 252.
118. Stagni G., Davis P., Ludden T.: *Human Pharmacokinetics of Betaxolol Enantiomers.* J. Pharm. Sci. 1991, 80, 321.
119. Stoschitzky K., Schumacher M., Stark G. i wsp.: *Exercise Increases Plasma Concentrations of (R)-and (S)-Propranolol.* Eur. J. Clin. Pharm. 1996, 50, 339.
120. Straka R., Johnson K., Marshall P. i wsp.: *Analysis of Metoprolol Enantiomers in Human Serum by Liquid Chromatography on a Cellulose-Based Chiral Stationary Phase.* J. Chromatogr. 1990, 24, 83.
121. Temple M., Nahata M.: *Treatment of Pediatric Hypertension.* Pharmacotherapy, 2000, 20, 140.
122. Vandenbosch C., Hamoir T., Massart D. i wsp.: *Evaluation of the Enantioselectivity towards  $\beta$ -Blocking Agents of the  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein Type Chiral Stationary Phase: Chiral-AGP.* Chromatographia. 1992, 33, 454.
123. Vandenbosch C., Massart D., Lindner W.: *Evaluation of six Chiral Stationary Phases in LC for their Selectivity towards Drug Enantiomers.* J. Pharm. Biochem. Anal. 1992, 10, 895.

124. Verbesselt R., Zugravu A., Tjandramaga T. i wsp.: *Liquid Chromatographic Determination of Total Celiprolol or (S)-Celiprolol and (R)-Celiprolol Simultaneously in Human Plasma*. J. Chromatogr. B. 1996, 683, 231.
125. Walily A.: *Analysis of Nifedipine-Acebutolol Hydrochloride Binary Combination in Tablets Using UV-Derivative Spectroscopy, Capillary Gas Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography*. J. Pharm. Biomed. Anal. 1997, 16, 21.
126. Ward T.: *Macrocyclic Antibiotics, the Newest Class of Chiral Selectors*. LC-GC INTL. 1998, 428.
127. Welch C., Perrin S.: *Improved Chiral Stationary Phase for  $\beta$ -Blocker Enantioseparations*. J. Chromatogr. A: 1995, 690, 218.
128. Wen Y., Wu S., Wu H.: *Chiral Separation of Acebutolol by Derivatization and High-Performance Liquid Chromatography*. J. Liq. Chromatogr. 1995, 18, 3329.
129. Wiela-Hojeńska A., Orzechowska-Juzwenko K.: *Kliniczne znaczenie stereowybiórczości leków*. Farm. Polska. 1995, 51, 653.
130. Winkle R., Meffin P., Ricks W. i wsp.: *Acebutolol Metabolite Plasma Concentration During Chronic Oral Therapy*. Br. J. Clin. Pharmacol. 1977, 4, 519.
131. Zejc A.: *Nowe  $\beta$ -adrenolityki o działaniu rozszerzającym naczynia*. Farm. Pol. 1994, 50, 344.
132. Zhang H., Stewart J., Ujhelyi M.: *High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Pindolol Enantiomers in Human Serum and Urine Using a Reversed-Phase Cellulose-Based Chiral Column*. J. Chromatogr. B. 1995, 668, 309.



## 12. Spis rycin

<b>Rycina 1.</b> Schemat otwartego modelu trójkompartimentowego opisującego dyspozycję leków $\beta$ -adrenolitycznych w organizmie.....	9
<b>Rycina 2.</b> Schemat obrazujący główne drogi metabolizmu acebutololu.....	11
<b>Rycina 3.</b> Schemat reakcji upochodnienia acebutololu oraz diacetololu.....	32
<b>Rycina 4.</b> Widma absorpcyjne dla acebutololu (a) i diacetololu (b).....	38
<b>Rycina 5.</b> Wpływ ilości acetonitrylu w fazie ruchomej na rozdział AC, DC oraz IS (HC 36096).....	39
<b>Rycina 6.</b> Wpływ ilości kwasu ortofosforowego w fazie ruchomej na rozdział AC, DC oraz IS (HC 36096).....	40
<b>Rycina 7.</b> Zależność odpowiedzi detektora UV-VIS od ilości nanoszonych na kolumnę racemicznych AC i DC.....	41
<b>Rycina 8.</b> Przykładowe chromatogramy: próbki wzorcowej zawierającej racemiczny AC i DC o stężeniu 250 ng/mL oraz IS o stężeniu 2000 ng/mL (a), osocza kontrolnego (bez leku) (b), osocza zawierającego racemiczny AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz IS o stężeniu 2000 ng/mL (c), osocza pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (d).....	42
<b>Rycina 9.</b> Przykładowe chromatogramy: próbek pełnej krwi kontrolnej (bez leku) (a), pełnej krwi zawierającej AC i DC o stężeniu 250 ng/mL (b), pełnej krwi pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (c).....	43
<b>Rycina 10.</b> Przykładowe chromatogramy: próbek erytrocytów (bez leku) (a), erytrocytów zawierającej AC i DC o stężeniu 250 ng/mL (b), erytrocytów pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (c).....	43
<b>Rycina 11.</b> Krzywe wzorcowe racemicznego AC i DC wyznaczone dla: osocza (a), pełnej krwi (b), erytrocytów (c).....	45
<b>Rycina 12.</b> Wykresy zależności odpowiedzi detektora UV-VIS od ilości nanoszonych na kolumnę enancjomerów S(-)-AC i R(+)-AC	

- (a) oraz S(-)-DC i R(+)-DC (b)..... 51
- Rycina 13.** Przykładowe chromatogramy: próbki wzorcowej enancjomerów AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz PI o stężeniu 300 ng/mL (a), osocza kontrolnego (bez leku) (b), osocza zawierającego enancjomery AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz PI o stężeniu 300 ng/mL (c), osocza pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (d), otrzymane metodą pośrednią..... 52
- Rycina 14.** Przykładowe chromatogramy: pełnej krwi kontrolnej (bez leku) (a), pełnej krwi zawierającej enancjomery AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz PI o stężeniu 300 ng/mL (b), pełnej krwi pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (c), otrzymane metodą pośrednią..... 53
- Rycina 15.** Krzywe wzorcowe enancjomerów R(+)-AC i S(-)-AC (a) oraz enancjomerów R(+)-DC i S(-)-DC (b) wyznaczone dla osocza (metoda pośrednia)..... 54
- Rycina 16.** Krzywe wzorcowe enancjomerów R(+)-AC i S(-)-AC (a) oraz enancjomerów R(+)-DC i S(-)-DC (b) wyznaczone dla pełnej krwi (metoda pośrednia)..... 55
- Rycina 17.** Przykładowe chromatogramy przedstawiające wpływ doboru składu i szybkości przepływu fazy ruchomej na rozdział badanych enancjomerów..... 59
- Rycina 18.** Wykresy zależności odpowiedzi detektora UV-VIS od ilości nanoszonych na kolumnę enancjomerów: S(-)-AC i R(+)-AC (a) oraz S(-)-DC i R(+)-DC (b), (metoda bezpośrednia)..... 60
- Rycina 19.** Przykładowe chromatogramy: próbki wzorcowej enancjomerów AC i DC o stężeniu 250 ng/mL oraz IS o stężeniu 300 ng/L (a), osocza kontrolnego (bez leku) (b), osocza zawierającego enancjomery AC i DC o stężeniu 250 ng/mL oraz IS o stężeniu 300 ng/mL (c), osocza pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (d)..... 61

- Rycina 20.** Przykładowe chromatogramy: pełnej krwi kontrolnej (bez leku) (a), pełnej krwi zawierającej enancjomery AC i DC o stężeniu 250 ng/mL oraz IS o stężeniu 300 ng/mL (b), pełnej krwi pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (c)..... 62
- Rycina 21.** Krzywe wzorcowe enancjomerów S(-)AC i R(+)-AC (a) oraz S(-)DC i R(+)-DC (b) wyznaczone dla osocza (metoda bezpośrednia, detekcja UV-VIS)..... 63
- Rycina 22.** Krzywe wzorcowe enancjomerów: S(-)-AC i R(+)-AC (a) oraz S(-)-DC i R(+)-DC (b) wyznaczone dla pełnej krwi..... 64
- Rycina 23.** Przykładowe chromatogramy przedstawiające zależność odpowiedzi detektora od długości fali wzbudzenia i emisji dla enancjomerów AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz S(+)-PR o stężeniu 2000 ng/mL..... 69
- Rycina 24.** Wykresy zależności odpowiedzi detektora spektrofluorymetrycznego od ilości nanoszonych na kolumnę enancjomerów: S(-)-AC i R(+)-AC (a) oraz S(-)-DC i R(+)-DC (b), (metoda bezpośrednia)..... 70
- Rycina 25.** Przykładowe chromatogramy: próbki wzorcowej enancjomerów AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz IS o stężeniu 2000 ng/mL (a), osocza kontrolnego (bez leku) (b), osocza zawierającego enancjomery AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz IS o stężeniu 2000 ng/mL (c), osocza pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (d), (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofluorymetryczna)..... 71
- Rycina 26.** Przykładowe chromatogramy: próbek pełnej krwi kontrolnej (bez leku) (a), pełnej krwi zawierającej enancjomery AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz IS o stężeniu 2000 ng/mL (b), pełnej krwi pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (c)..... 72

- Rycina 27.** Przykładowe chromatogramy: próbek erytrocytów (bez leku) (a), erytrocytów zawierających enancjomery AC i DC o stężeniu 500 ng/mL oraz IS o stężeniu 2000 ng/mL (b), erytrocytów pacjenta leczonego acebutololem w dawce 400 mg/dobę (c)..... 72
- Rycina 28.** Krzywe wzorcowe enancjomerów S(-)-AC i R(+)-AC (a) oraz enancjomerów S(-)-DC i R(+)-DC (b) wyznaczone dla osocza, z zastosowaniem metody bezpośredniej z detekcją spektrofluorymetryczną..... 73
- Rycina 29.** Krzywe wzorcowe enancjomerów S(-)-AC i S(-)-DC (a) oraz enancjomerów R(+)-AC i R(+)-DC (b) wyznaczone dla pełnej krwi, z zastosowaniem metody bezpośredniej z detekcją spektrofluorymetryczną..... 74
- Rycina 30.** Krzywe wzorcowe enancjomerów S(-)-AC i R(+)-AC (a) oraz enancjomerów S(-)-DC i R(+)-DC (b) wyznaczone dla erytrocytów, z zastosowaniem metody bezpośredniej z detekcją spektrofluorymetryczną..... 75
- Rycina 31.** Wykresy zależności pomiędzy stężeniem enancjomerów AC (a) i enancjomerów DC (b) oznaczanych w osoczu, odpowiednio metodą pośrednią oraz metodą bezpośrednią, z zastosowaniem detekcji UV-VIS..... 81
- Rycina 32.** Wykresy zależności pomiędzy stężeniem enancjomerów AC (a) i enancjomerów DC (b) oznaczanych w osoczu, odpowiednio metodą pośrednią z detekcją UV-VIS oraz metodą bezpośrednią z detekcją spektrofluorymetryczną..... 82
- Rycina 33.** Wykresy zależności pomiędzy stężeniem enancjomerów AC (a) i enancjomerów DC (b) oznaczanych w osoczu, odpowiednio metodą bezpośrednią z detekcją UV-VIS oraz metodą bezpośrednią z detekcją spektrofluorymetryczną..... 83

- Rycina 34.** Zależność średnich wartości stężeń racemicznego AC (a) oraz DC (b) w stanie stacjonarnym, jako funkcja czasu, oznaczanych w osoczu badanych chorych, po podaniu różnych dawek leku..... 85
- Rycina 35.** Zależność średnich wartości stężeń racemicznego AC (a) oraz DC (b), w stanie stacjonarnym, jako funkcja czasu, oznaczanych w pełnej krwi badanych chorych, po podaniu różnych dawek leku..... 86
- Rycina 36.** Zależność średnich wartości stężeń stacjonarnych enancjomerów S(-)AC i R(+ )AC (a) oraz S(-)DC i R(+ )DC (b) jako funkcja czasu oznaczanych w osoczu badanych chorych, (n=9)..... 91
- Rycina 37.** Zależność średnich wartości stężeń stacjonarnych enancjomerów S(-)AC i R(+ )AC (a) oraz S(-)DC i R(+ )DC (b) jako funkcja czasu oznaczanych w pełnej krwi badanych chorych, (n=9)..... 92

### 13. Spis tabel

<b>Tabela 1.</b> Achiralne metody HPLC oznaczania acebutololu oraz diacetololu.....	15
<b>Tabela 2.</b> Przykładowe chiralne fazy stacjonarne stosowane w technice HPLC.....	19
<b>Tabela 3.</b> Charakterystyka badanych chorych.....	35
<b>Tabela 4.</b> Parametry jakości rozdziału chromatograficznego badanych związków, w osoczu, pełnej krwi i erytrocytach.....	44
<b>Tabela 5.</b> Wartości stężeń dolnej granicy wykrywalności oraz dolnej granicy oznaczalności dla racemicznego AC i DC w osoczu, pełnej krwi oraz erytrocytach.....	46
<b>Tabela 6.</b> Precyzja i dokładność metody oznaczania racemicznego AC i DC w osoczu.....	47
<b>Tabela 7.</b> Precyzja i dokładność metody oznaczania racemicznego AC i DC w pełnej krwi.....	47
<b>Tabela 8.</b> Precyzja i dokładność metody oznaczania racemicznego AC i DC w erytrocytach.....	47
<b>Tabela 9.</b> Wydajność procesu ekstrakcji racemicznego AC i DC z osocza.....	48
<b>Tabela 10.</b> Wydajność procesu ekstrakcji racemicznego AC i DC z pełnej krwi.....	48
<b>Tabela 11.</b> Wydajność procesu ekstrakcji racemicznego AC i DC z RBC.....	48
<b>Tabela 12.</b> Parametry jakości rozdziału chromatograficznego badanych enancjomerów w osoczu i pełnej krwi.....	53
<b>Tabela 13.</b> Wartości stężeń dolnej granicy wykrywalności oraz dolnej granicy oznaczalności dla enancjomerów AC i DC w osoczu i pełnej krwi.....	56

<b>Tabela 14.</b> Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w osoczu, odpowiednio w jednym dniu i w różnych dniach.....	56
<b>Tabela 15.</b> Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w pełnej krwi, odpowiednio w jednym dniu i w różnych dniach.....	57
<b>Tabela 16.</b> Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów AC i DC z osocza.....	57
<b>Tabela 17.</b> Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów AC i DC z pełnej krwi.....	58
<b>Tabela 18.</b> Parametry jakości rozdziału chromatograficznego badanych związków.....	62
<b>Tabela 19.</b> Wartości stężeń dolnej granicy wykrywalności oraz dolnej granicy oznaczalności dla enancjomerów AC i DC w osoczu i pełnej krwi.....	65
<b>Tabela 20.</b> Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w osoczu, odpowiednio w jednym dniu i w różnych dniach.....	65
<b>Tabela 21.</b> Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w pełnej krwi, odpowiednio w jednym dniu i w różnych dniach.....	66
<b>Tabela 22.</b> Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów AC i DC z osocza.....	66
<b>Tabela 23.</b> Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów AC i DC z pełnej krwi.....	67
<b>Tabela 24.</b> Wartości stężeń dolnej granicy wykrywalności oraz dolnej granicy oznaczalności dla enancjomerów AC i DC w osoczu, pełnej krwi i erytrocytach, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofluorymetryczna).....	76

<b>Tabela 25.</b> Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w osoczu, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofluorymetryczna).....	77
<b>Tabela 26.</b> Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w pełnej krwi, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofluorymetryczna).....	77
<b>Tabela 27.</b> Precyzja i dokładność metody oznaczania enancjomerów AC i DC w erytrocytach, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofluorymetryczna).....	78
<b>Tabela 28.</b> Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów AC i DC z osocza, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofluorymetryczna).....	78
<b>Tabela 29.</b> Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów AC i DC z pełnej krwi, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofluorymetryczna).....	79
<b>Tabela 30.</b> Wydajność procesu ekstrakcji [%] enancjomerów AC i DC z erytrocytów, (metoda bezpośrednia, detekcja spektrofluorymetryczna).....	79
<b>Tabela 31.</b> Dane demograficzne chorych leczonych acebutololem.....	84
<b>Tabela 32.</b> Średnie wartości stosunku stężeń DC do AC wyznaczone w osoczu chorych, po różnych czasach, w zależności od dawki leku.....	87
<b>Tabela 33.</b> Średnie wartości stosunku stężeń DC do AC wyznaczone w pełnej krwi chorych, po różnych czasach, w zależności od dawki leku.....	87
<b>Tabela 34.</b> Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych AC i DC obliczone na podstawie stężeń oznaczonych metodą achiralną w osoczu badanej grupy chorych.....	88
<b>Tabela 35.</b> Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych AC i DC obliczone na podstawie stężeń oznaczonych metodą achiralną w pełnej krwi badanych chorych.....	88



<b>Tabela 36.</b> Dane demograficzne chorych leczonych acebutololem.....	90
<b>Tabela 37.</b> Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych enancjomerów AC i DC obliczone na podstawie stężeń oznaczanych metodą chiralną w osoczu badanych chorych.....	93
<b>Tabela 38.</b> Średnie wartości parametrów farmakokinetycznych enancjomerów AC i DC obliczone na podstawie stężeń oznaczanych metodą chiralną w pełnej krwi badanych chorych.....	93
<b>Tabela 39.</b> Procent wiązania (f) racemicznego AC i DC z erytrocytami obliczony dla badanej grupy chorych, w różnych czasach.....	95
<b>Tabela 40.</b> Współczynnik podziału erytrocyty/osocze ( $K_{E/O}$ ) dla racemicznego AC oraz DC obliczony w warunkach in vivo.....	95
<b>Tabela 41.</b> Procent wiązania (f) enancjomerów AC oraz DC z erytrocytami, obliczony dla warunków in vivo.....	96
<b>Tabela 42.</b> Współczynnik podziału erytrocyty/osocze ( $K_{E/O}$ ) dla enancjomerów AC oraz DC obliczony w warunkach in vivo.....	96
<b>Tabela 43.</b> Procent wiązania (f) z erytrocytami dla racemicznego AC i DC, w zależności od stężenia związku.....	97
<b>Tabela 44.</b> Współczynnik podziału erytrocyty/osocze ( $K_{E/O}$ ) dla racemicznego AC i DC, w zależności od stężenia związku.....	97
<b>Tabela 45.</b> Procent wiązania (f) enancjomerów AC oraz DC z erytrocytami, w zależności od stężenia tych enancjomerów.....	98
<b>Tabela 46.</b> Współczynnik podziału erytrocyty/osocze ( $K_{E/O}$ ) dla enancjomerów AC oraz DC, w zależności od stężenia tych enancjomerów.....	99

