Методы и объекты химического анализа, 2006, т. 1, № 2, С. 147–151.

Определение концентрации свободного каптоприла в плазме крови методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием

А.В. Пирогов, А.А. Бендрышев, Е.Б. Пашкова, А.В. Шпак, О.А. Шпигун

Московский государственный университет, химический факультет
119992, ГСП-2, Ленинские горы, Москва, Россия; pirogov@analyt.chem.msu.ru

Разработан хроматографический селективный и чувствительный способ определения каптоприла в плазме крови, основанный на предварительной дериватизации с n-хлорфенацил бромидом, разделении на колонках с гидрофильным эндкеппингом и масс-спектрометрическим детектированием с ионизацией электронным ударом в режиме детектирования положительных ионов. Калибровочная зависимость носила линейный характер в диапазоне концентраций 7–500 мкг/л каптоприла с коэффициентом корреляции R^2=0,9977. Предел обнаружения 4 мкг/л на масс-спектрометрическом детекторе при детектировании по выделенному иону m/z=370, соответствующему производному каптоприла. Значение эффективности колонки по пику производного каптоприла составляет 9800 теоретических тарелок на метр. Показана применимость разработанного способа определения при изучении фармакокинетики.

A chromatographic technique for the selective and sensitive determination of captopril in human serum was developed. The technique is based on pre-column derivatization of captopril with p-chlorophenacyl bromide followed by a separation on a column with hydrophilic endcapping and MS-ESI detection in positive mode. The calibration plot is linear in range of concentration of captopril from 7 to 500 ppb (R^2=0.9977). The limit of detection of the captopril derivative is 4 ppb in SIM mode ($[M+H]^+$, m/z=370). An average efficiency of the determination of captopril is 9800 theoretical plates per meter. An application of the developed technique for the study of pharmacokinetics was demonstrated.

Ключевые слова: *каптоприл, ВЭЖХ-МС, плазма крови, фармакокинетика.*
Keywords: *captopril, HPLC/MS, human serum, pharmacokinetics.*

Каптоприл (1-[(2S)-3-меркапто-2-метил-пропионил]-L-пролин) является широко используемым в современной медицинской практике средством, понижающим кровяное давление. В плазме каптоприл легко образует дисульфиды и дисульфидные конъюгаты с эндогенными тиол-содержащими веществами [1]. Однако, только свободный каптоприл является фармакологически активным. Причем образование неактивных дисульфидов является обратимым процессом и эти соединения могут служить в качестве резервуара для постепенного поступления каптоприла в кровь. Как следствие, определение концентрации свободного каптоприла в плазме крови важно для предсказания лечебного эффекта и расчета терапевтической дозы.

Обычно определяют общее содержание каптоприла в крови, восстанавливая дисульфиды подходящим реагентом. В работах [2, 3] для этой цели использовали бутилфосфин, а в работе [4] – метанольный раствор BF_3. Следует отметить, что данные методы достаточно трудоемки, дороги, применяемые реагенты часто ядовиты.

Для снижения пределов обнаружения при определении каптоприла часто используют реакции дериватизации для перевода его в соединение, интенсивно поглощающее ультрафиолетовое излучение или флуоресцирующее. Кок с сотрудниками [5] для получения производных каптоприла использовали монобромбиман и ортофталевый альдегид. Пределы обнаружения каптоприла в плазме крови составили 12,5 нг/мл и 25 нг/мл соответственно. При определении больших концентраций каптоприла (например, в таблетках) возможно применять реакцию с неокупроином [6], или метод газовой хроматографии с предварительным получением летучего производного с бис-пентафторбензолом [7]. Однако из-за того, что значительное количество каптоприла в плазме крови содержится в виде дисульфидов, методы не

© А.В. Пирогов, А.А. Бендрышев, Е.Б. Пашкова, А.В. Шпак, О.А. Шпигун

обладают необходимой чувствительностью. Для решения этой проблемы можно использовать твердофазную [8] или жидкостную экстракцию [9].

В данной работе продемонстрирован подход к определению свободного каптоприла в плазме крови человека после орального принятия обычных терапевтических доз лекарства с помощью метода ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием без предварительной экстракции.

Материалы и методика исследований

Анализы проводили на жидкостном хроматографе Agilent-1100 (США) со спектрофотометрическим детектором на диодной матрице и масс-спектрометрическим квадрупольным детектором в режиме регистрации положительных ионов. Метод ионизации – электронный удар, энергия электронов – 70 Эв. Установка фрагментора: 100. Колонка Phenomenex Synergi Hydro (США), 150х2 мм. Температура разделения 30°С. Элюирование проводили в градиентном режиме. Элюент А: 0,6% водный раствор уксусной кислоты. Элюент В: ацетонитрил. Режим градиента: 0–12 минут – 63% элюент А, 37% элюент В; 13–17 минут – 5% элюент А, 95% элюент В; 18–22 минуты – 63% элюент А, 37% элюент В. Такой режим необходим для селективного определения каптоприла и вымывания с колонки сильноудерживаемых компонентов пробы. Скорость потока элюента составляла 0,3 мл/мин. Пробы вводили с помощью автосамплера. Объем вводимой пробы – 30 мкл. В работе использовали ацетонитрил фирмы Panreac (Испания), квалификации "gradient grade". Каптоприл был получен из фирмы Sigma, остальные реактивы имели чистоту не ниже "ч.д.а.". Для приготовления всех рабочих растворов и элюента использовали дистиллированную и деионизованную воду сопротивлением не ниже 13 МОм. Исходные растворы реагентов хранили в холодильнике при 4°С, а рабочие растворы готовили из исходных непосредственно перед использованием.

К 500 мкл плазмы добавляли 500 мкл ацетонитрила, перемешивали в ультразвуковой бане в течение 10 секунд и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 5 минут. Отбирали 800 мкл надосадочной жидкости и добавляли 200 мкл ацетонитрильного раствора *п*-хлор-фенацил бромида. Смесь перемешивали в ультразвуковой бане в течение 10 секунд и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 3 минут. Затем добавляли 40 мкл 10% метанольного раствора триэтиламина. Смесь встряхивали в течение 15 минут на вортексе. Перед вводом в хроматограф смесь подкисляли 10 мкл 10% соляной кислоты. Степень протекания реакции дериватизации контролировали масс-спектрометрически (в режиме сканирования ионов и регистрации выделенного иона). Отсутствие в пробе соединений со временем удерживания, характерным для каптоприла (2,3 мин) и соответствующим масс-спектром (m/z=218) свидетельствует о полноте протекания реакции дериватизации.

Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения "Chemstation" (версия 10.02) фирмы Agilent. Для построения калибровочных кривых использовали результаты анализа проб плазмы с добавлением известных количеств каптоприла.

Результаты исследований и их обсуждение

Каптоприл является гидрофильным соединением, характеризующимся достаточно малым поглощением излучения в ультрафиолетовой области спектра (λ_{max}=230 нм) и слабым удерживанием на обращенно-фазовых колонках. Для увеличения удерживания, молекулярной массы регистрируемого соединения (для более чувствительного спектрофотометрического и масс-спектрометрического детектирования) целесообразно использовать колонки с гидрофильным эндкеппингом сорбента и проводить предколоночную дериватизацию. В качестве дериватизирующего агента выбран n-хлорфенацил бромид. Схема реакции получения производного каптоприла представлена на рис.1.

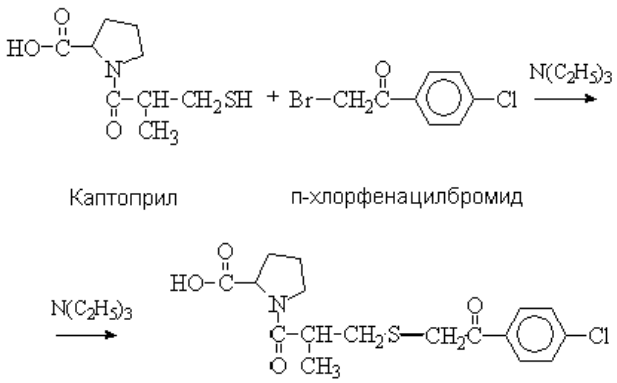


Рис. 1. Схема реакции дериватизации для получения производного каптоприла

Найдено, что для проведения реакции необходим избыток дериватизирующего реагента, присутствие основания (не являющегося хорошим нуклеофилом) и перемешивание в течение 15 минут. Повышение температуры до 40°С существенно не ускоряет реакцию, однако на хроматограмме появляются дополни-

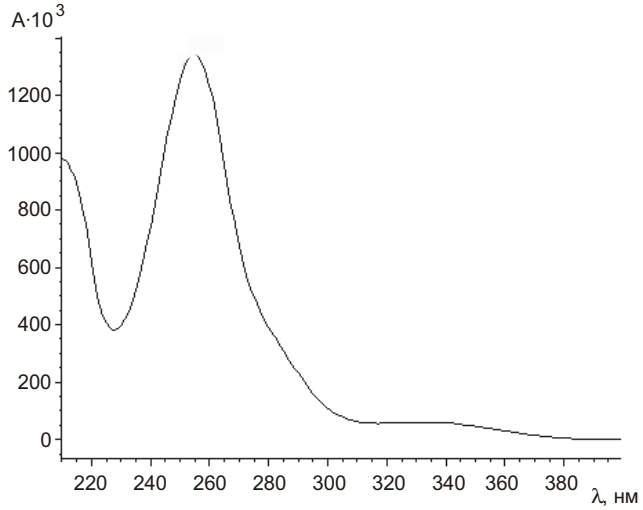


Рис. 2. УФ-спектр поглощения производного каптоприла. $C_{каптоприл}$ = 2,17 мкг/мл, l = 1 см

тельные пики, свидетельствующие, вероятно, о протекании побочных реакций. Степень извлечения производного каптоприла (отсутствие сорбции на белках плазмы) подтвердили методом введено-найдено. Молекулярная масса полученного производного равна 368,5. УФ-спектр образующегося соединения представлен на рис. 2 (λ_{max}=258 нм).

В условиях анализа время удерживания производного каптоприла составило 10,45±0,15 мин. Калибровочная зависимость носила линейный характер в диапазоне концентраций 7–500 мкг/л. График описывается линейным уравнением y=ax+b, где a=15,512; b=51,053. Коэффициент корреляции R^2=0,9977. Предел обнаружения 4 мкг/л на масс-спектрометрическом детекторе при детектировании по выделенному иону m/z=370. Относительное стандартное отклонение S_r=0,08 (n=3). Значение эффективности колонки по пику производного каптоприла составляет 9800 теоретических тарелок на метр.

На рис. 3а представлены хроматограммы чистой плазмы, не содержащей каптоприл (бланк) полученные с помощью спектрофотометрического и масс-спектрометрического детекторов. Видно, что количественное спектрофотометрическое определение каптоприла при λ = 258 нм (рис. 3б) затруднено из-за наличия эндогенного соединения, имеющего примерно то же время удерживания(около 10 минут), что и производное каптоприла. Варьированием состава элюента не удалось разделить пики данных веществ, и поэтому в дальнейшем применяли только масс-спектрометрическое детектирование.

На рис. 4 представлены хроматограмма плазмы крови с добавкой каптоприла (3 мкг/мл) и масс-спектр обнаруженного соединения. Такая достаточно

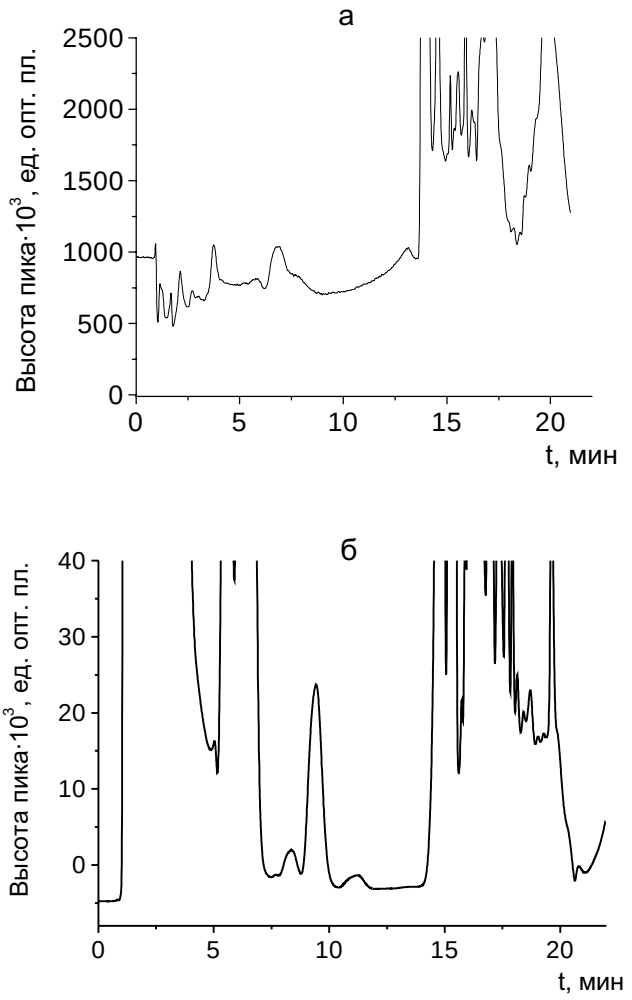
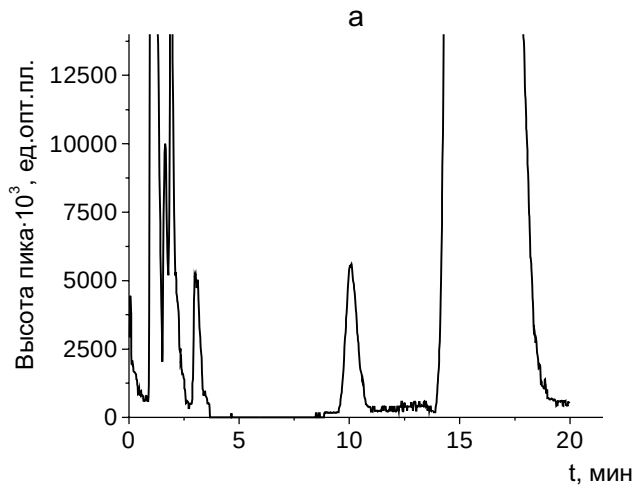


Рис. 3. Хроматограмма образца плазмы крови без каптоприла (бланк): (а) масс-спектрометрическое детектирование (m/z=370); (б) спектрофотометрическое детектирование (λ=258 нм).

большая концентрация лекарственного вещества объясняется измененным режимом детектирования. Его проводили в режиме сканирования ионов в диапазоне 150–550 с целью подтверждения чистоты пика производного каптоприла. Видно, что масс-спектр и соотношение изотопных пиков соответствуют производному каптоприла $[M–H]^+$ и веществ с другими массами в заметных количествах не наблюдается.

Для изучения изменений содержания каптоприла в плазме крови человека в зависимости от времени (фармакокинетики) у трех добровольцев отобраны образцы крови после орального приема лекарственного препарата, содержащего 25 мг каптоприла. Хроматограмма образца плазмы представлена на рис. 5., а графики фармакокинетики на рис. 6. Вид-



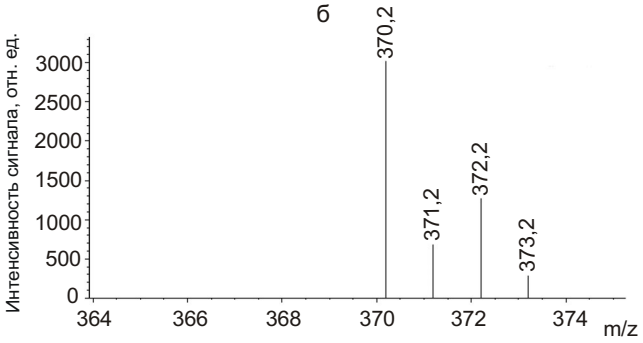


Рис. 4. Хроматограмма образца плазмы крови с добавками каптоприла (концентрация 3 мкг/мл) (а) и соотвествующий масс-спектр соединения (режим полного ионного тока) (б)

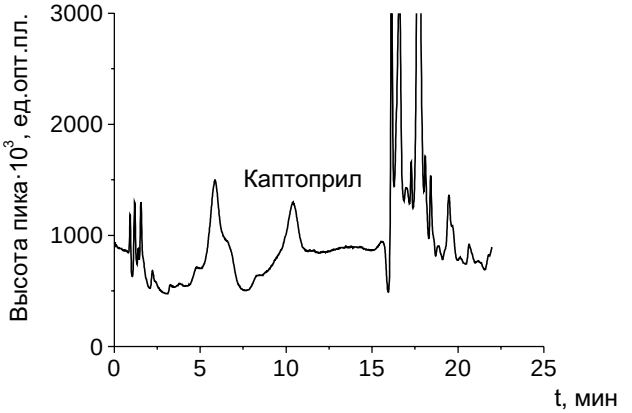


Рис. 5. Хроматограмма образца плазмы крови содержащей 62 мкг/л каптоприла. Режим детектирования по выделенному иону m/z=370. Остальные условия, как на рис. 3

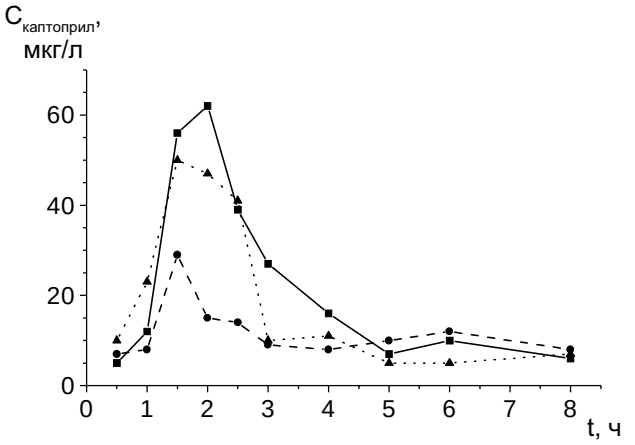


Рис. 6. Фармакокинетика каптоприла в плазме крови человека (3 человека)

но, что концентрация свободного каптоприла может составлять несколько десятков мкг/л (зависит от индивидуальной скорости метаболизма). Причем максимальная концентрация каптоприла в плазме крови наблюдается через 1–2 часа после приема, а затем медленно уменьшается (иногда проходя снова через максимум). Это может свидетельствовать о возможном поступлении каптоприла в кровь из-за разрушения дисульфидных конъюгатов.

Заключение

Таким образом, разработан селективный и чувствительный метод определения каптоприла в плазме крови, способный применяться в медицинских исследованиях.

Литература

1. *Wieling J., Hendriks G, Tamminga W.J., Hempenius J., Mensink C.K., Oosterhuis B., Jonkman J.H.G.* Rational experimental design for bioanalytical methods validation. Illustration using an assay method for total captopril in plasma // J.Chromatogr. A. – 1996. – 730. – P. 381–394.

2. *Toyo'oka T., Imai K., Kawahara Y.* Determination of total captopril in dog plasma by h.p.l.c. after pre-labelling with ammonium 7-fluorobenzofurazan-4-sulphonate (SBD-F) // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1984. – 2. –P. 473–479.
3. *Hayashi K., Miyamoto M., Sekine Y.* Determination of captopril and its mixed disulphides in plasma and urine by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. – 1985. – 338. – P. 161–169.
4. *Liu C.Y., Liu S.L., Chen H.N., Xie X.T.* Determination of captopril in tablets by gas chromatography // Sepu. – 1998. – 16. –P. 82–83.
5. *Kok R.J., Visser J., Moolenaar F., de Zeeuw D., Meijer D.K.F.* Bioanalysis of captopril: two sensitive high-performance liquid

chromatographic methods with pre- or postcolumn fluorescent labeling // J. Chromatogr. B. – 1997. – 693. – P. 181–189.
6. *Ma W.X.* A new method for the determination of captopril // Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi. – 1999. – 19. – P. 118–119.
7. *Franklin M.E., Addison R.S., Baker P.V., Hooper W.D.* Improved analytical procedure for the merasurement of captopril in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies // J. Chromatogr. B. – 1998. – 705. – P. 47–54.
8. *Papadoyannis I.N., Samanidou V.F., Georga K.A., Georgarakis E.* High-pressure liquid-chromatographic determination of hydrochlorothiazide (HCT) in pharmaceutical preparation and human serum after solid-phase extraction // J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. – 1998. – 21. – P. 1671–1683.
9. *Jankowski A., Skorek A., Krzysko K., Zarzycki P.K., Ochocka R.J., Lamparczyk H.* Captopril: determination in blood and pharmacokinetics after single oral dose // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1995. – 13. – P. 655–660.