АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОГО КАПТОПРИЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ПРЕДКОЛОНОЧНОЙ ДЕРИВАТИЗАЦИЕЙ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Аналитические решения
Markets and Applications Programs

Agilent Technologies
Authorized Partner Laboratory

Авторы

А.В. Пирогов (Andrey Pirogov)

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет.

Е.Б. Пашкова (Elena Pashkova)
ООО “Бион”



Разработан хроматографический селективный и чувствительный способ определения каптоприла в плазме крови, основанный на предварительной дериватизации с n-хлорфенацилбромидом, разделении на колонках с гидрофильным эндкеппингом и масс-спектрометрическим детектированием с электрораспылительной ионизацией 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 протонированному производному каптоприла. Значение эффективности колонки по пику производного каптоприла составляет 10 000 теоретических тарелок на метр. Показана применимость разработанного способа определения при изучении фармакокинетики.

Введение

Каптопри л или 1-[(2S)-3-меркапто]-2-метил-пропионил-L-пролин — лекарственное средство, один из препаратов группы ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (рис.1).

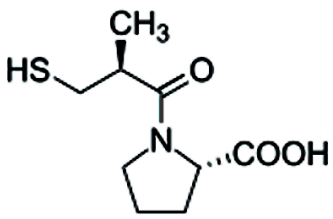


Рисунок 1. Химическая формула каптоприла.

Каптоприл является замедлителем действия энзимов ACE и применяется в медицине для лечения гипертонии. Хотя механизм действия каптоприла не изучен до конца, он снижает артериальное давление и оказывает благотворное действие на циркуляцию крови у пациентов с застойной сердечной недостаточностью и поэтому считается основным лекарственным средством во время лечения таких заболеваний, особенно, в случае если другие менее действенные средства не дали никаких желаемых результатов. Еще один интересный факт, связанный с действием каптоприла, состоит в том, что он повышает чувствительность к инсулину. В таком случае исследования каптоприла выглядят очень многообещающими. В организме каптоприл существует в свободном виде и в виде дисульфидных коньюгатов. Фармакологический эффект имеет только свободный каптоприл. Следовательно, необходимо знать концентрацию свободного каптоприла в крови для расчета терапевтической дозы. Обычно определяют общее содержание каптоприла в крови, восстанавливая дисульфиды подходящим реагентом. В работах [1, 2] для этой цели использовали бутилфосфин, а в работе [3] – метанольный раствор BF3. Следует отметить, что данные методы достаточно трудоемки, дороги, применяемые реагенты часто ядовиты. Для снижения пределов обнаружения при определении каптоприла можно использовать реакции дериватизации для перевода его в соединение, интенсивно поглощающее ультрафиолетовое излучение или флуоресцирующее. 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.

В молекуле каптоприла нет хороших хромофоров, поэтому его чувствительное спектрофотометрическое определение в реальных объектах затруднительно. Однако, даже в случае масс-спектрометрического детектирования, каптоприл часто соэлюируется с другими эндогенными соединениями плазмы крови, что приводит к завышенным результатам. Для повышения селективности определения предложено использовать предколоночную реакцию с п-хлорфенацилбромидом (рис.2).

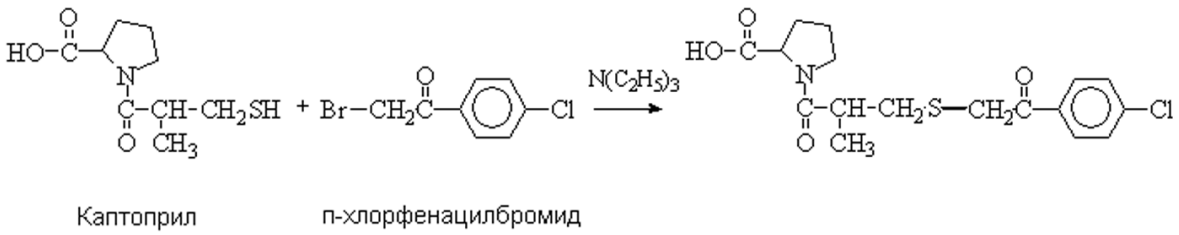


Рисунок 2. Схема реакции каптоприла с п-хлорфенацилбромидом.

Экспериментальная часть

Оборудование

Наименование	Кат номер, модель
1200 Бинарный насос	G1312A
1200 Дегазатор	G1379A
1200 Автосамлер	G1313A
1200 Термостат колонок	G1316A
1200 Диодно-матричный детектор	G1315B
Квадрупольный масс-спектрометр LC/MSD серии SL	G1956B

Растворы и реактивы

Использованы следующие реактивы Каптоприл (> 98%, Sigma, EC), п-хлорфенацилбромид (98%, Sigma-Aldrich, EC), триэтиламин (> 99%, Sigma-Aldrich, EC), ледяная уксусная кислота (Reag.Ph.Eur., 99,7%, Panreac, Испания), Ацетонитрил, квалификации чистоты «gradient grade» был получен из Biosolve Chemie, Нидерланды. Деионизованная вода получена с помощью Milli-Q Integral system, Миллипор, США.

Программное обеспечение

Agilent ChemStation 35900 A/D версия A 10.02.

Условия хроматографирования

Прараметр	Значение
Колонка	Phenomenex Hydro, 150x2 мм.
Элюирование	Градиентное
Элюент А	0,6 % водный раствор уксусной кислоты
Элюент В	Ацетонитрил
Программа градиента	0-12 мин – 37 %В, 13-17 мин – 95 %В, 18-22 мин – 37 %В
Скорость потока элюента	0,3 мл/мин
Температура термостата	30 °С
Объем пробы	30 мкл
Промывка иглы автосамплера	2 сек ацетонитрилом
Длина волны детектора	258 нм.
Ширина щели	4 нм.
Режим квадруполя	Положительный, электрораспылительная ионизация
Vcap	4000 В
Фрагментор	100 В
Распылитель	40 psig
Скорость потока газа осушителя	6 л/мин
Температура газа-осушителя	300 ^{0}C
Ионы	370 m/z
Скорость сбора данных	20 Hz

Пробоподготовка

К 500 мкл плазмы крови 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-хлорфенацилбромида. 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 трясли 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) путем добавок известного количества каптоприла в плазму. Отсутствие пика на месте удерживания каптоприла и соответствующего масс-спектра свидетельствует о полноте протекания реакции дериватизации. Степень извлечения производного каптоприла (отсутствие сорбции на белках плазмы) подтвердили методом введено-найдено. Она составляла 99-100 %. Молекулярная масса полученного производного равна 368,5.

Результаты и обсуждение

Количественное спектрофотометрическое определение каптоприла при длине волны 258 нм 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. 3 представлены хроматограмма плазмы крови с добавкой каптоприла (3 мкг/мл) и масс-спектр обнаруженного соединения. Достаточно большая концентрация лекарственного вещества объясняется режимом детектирования по полному ионному току. 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.

Калибровочную кривую получали в результате анализа проб плазмы с добавлением известных количеств каптоприла. Калибровочная зависимость носила линейный характер в диапазоне концентраций 7-500 мкг/л. Коэффициент корреляции R^2=0.9977. Предел обнаружения 4 мкг/л на масс-спектрометрическом детекторе и около 40 мкг/л на спектрофотометрическом детекторе при длине волны 258 нм. Относительное стандартное отклонение S(r)=0.08 (n=3).

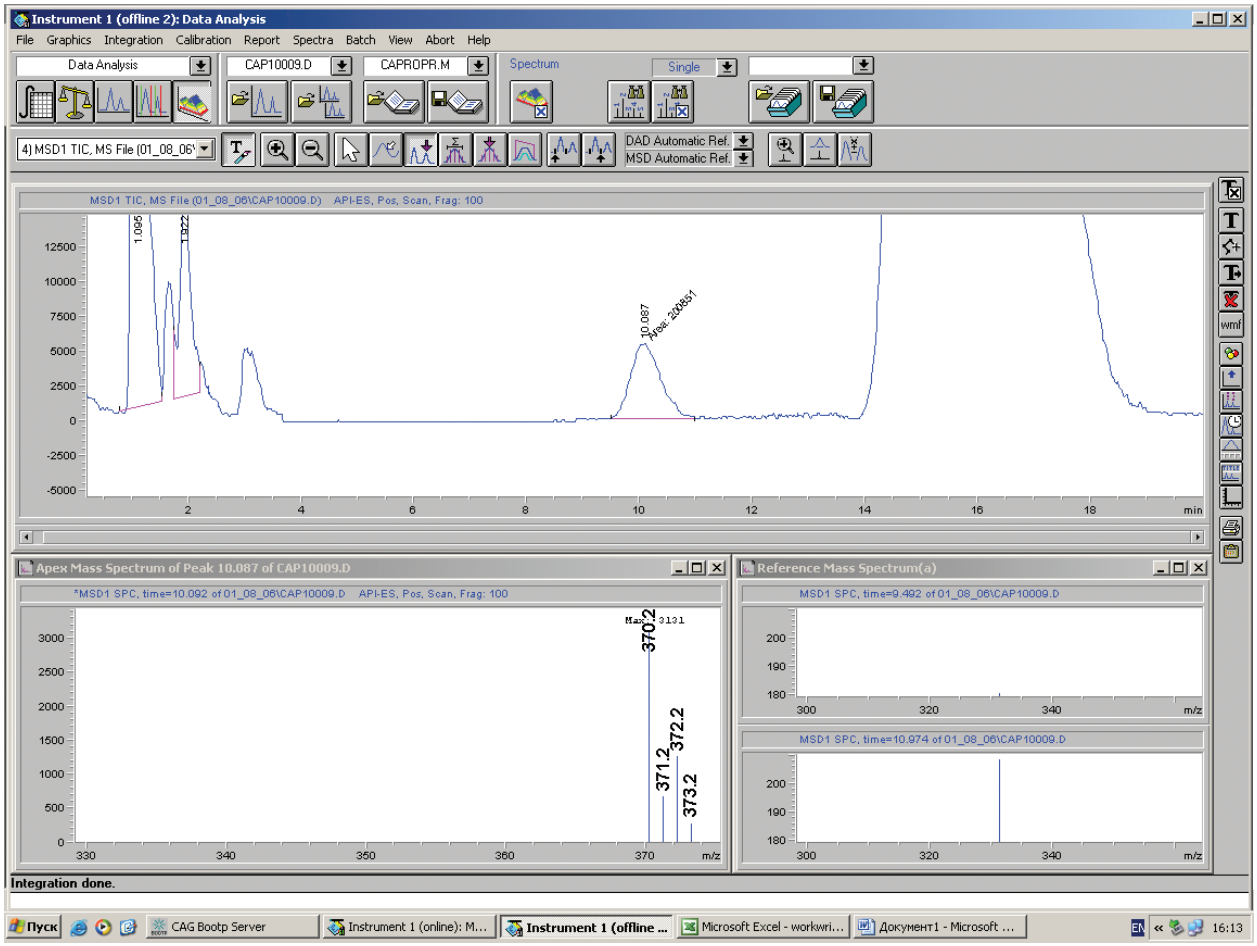


Рисунок 3. Хроматограмма плазмы крови, содержащей каптоприл (время удерживания 10,09 мин., концентрация 3 мкг/мл) и соотвествующий масс-спектр соединения (режим полного ионного тока).

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. Графики фармакокинетики представлены на рис. 4. Видно, 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 коньюгатов.

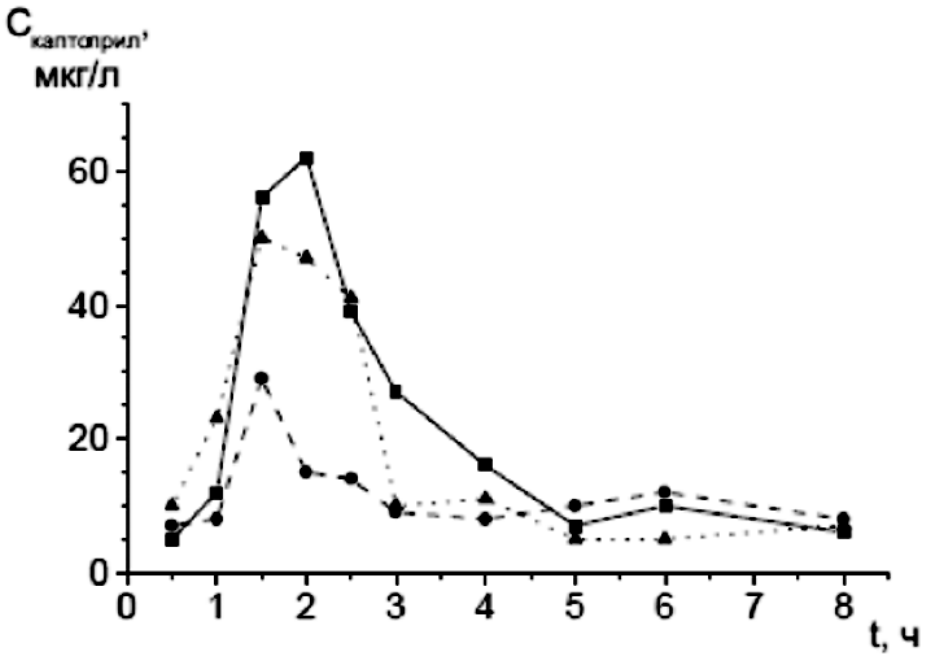


Рисунок 4. Фармакокинетика каптоприла в плазме крови 3 человек.

Заключение

Разработан селективный и чувствительный метод определения каптоприла в плазме крови, способный применяться в медицинских исследованиях.

Список литературы

1. E. Ivashkiv, D.N. McKinstry, A.I. Cohen, "Determination of total captopril in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry with selected-ion monitoring after reduction of disulfides", Journal of Pharmaceutical Sciences, 73(8), 1113-1117, 1984.
2. K. Hayashi, M. Miyamoto, Y. Sekine, "Determination of captopril and its mixed disulphides in plasma and urine by high performance liquid chromatography", J. Chromatogr. 338(1), 161-169, 1985.
3. C.Y. Liu, S.L. Liu, H.N. Chen, X.T. Xie, "Determination of captopril in tablets by gas chromatography", Sepu, 16(1), 82-83, 1998.

Контакты: Agilent MAPs:
maps_agilent@agilent.com

Дополнительная информация:
http://www.your-analytical-solution.com

This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2013
Published in USA, November 1, 2013
5991-3506RURU

The Measure of Confidence

Agilent Technologies