

1 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Россия, г. Москва, Петровский б-р, 8, стр. 2

2 – ГБУ города Москвы «Городская клиническая больница им. И.В. Давыдовского Департамента здравоохранения города Москвы», 119027, Россия, г. Москва, Яузская ул., 11

3 – ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

1 – Scientific Center for Expertise of Medicinal products of the Ministry of Health, 8/2, Petrovsky boulevard, Moscow, 127051, Russia

2 – The Moscow Department of Health I.V. Davydovsky City Clinical Hospital, 11, Yauzskaya str., Moscow, 119027, Russia

3 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: semina_tatiana@mail.ru

ЭКСПРЕСС-МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНАЛАПРИЛА И ЕГО ОСНОВНОГО МЕТАБОЛИТА ЭНАЛАПРИЛАТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

Т.А. Родина^{1,2*}, Е.С. Мельников^{2,3}, С.А. Белков^{1,2,3}, А.В. Соколов^{1,3}, А.Б. Прокофьев^{1,2,3}, А.С. Сивков³

Резюме. Предложена экспресс-методика одновременного определения эналаприла и эналаприлата в сыворотке крови человека с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС. Разработанную методику отличает простота выполнения пробоподготовки, короткое время анализа и аналитический диапазон для обоих определяемых веществ от 5,00 до 250,00 нг/мл. Данная методика удобна при проведении рутинных исследований, в частности для осуществления терапевтического лекарственного мониторинга, выполнения аналитического этапа исследований биоэквивалентности и оценки взаимозаменяемости препаратов эналаприла.

Ключевые слова: эналаприл, эналаприлат, ВЭЖХ-МС/МС, терапевтический лекарственный мониторинг, биоэквивалентность, взаимозаменяемость.

EXPRESS METHOD FOR DETERMINATION OF ENALAPRIL AND ENALAPRILAT IN HUMAN SERUM BY HPLC-MS/MS

T.A. Rodina^{1,2*}, E.S. Melnikov^{2,3}, S.A. Belkov^{1,2,3}, A.V. Sokolov^{1,3}, A.B. Prokofiev^{1,2,3}, A.S. Sivkov³

Abstract. The express method for simultaneous determination of enalapril and enalaprilat in human serum using HPLC-MS/MS is proposed. A simple sample preparation procedure, short analysis time, and a wide analytical range for both analytes (5.00 to 250.00 ng/mL) characterize this method. This technique is useful for carrying out routine research, such as therapeutic drug monitoring, bioequivalence studies and evaluation of the interchangeability of enalapril drug products.

Keywords: enalapril, enalaprilat, HPLC-MS/MS, therapeutic drug monitoring, bioequivalence, interchangeability.

ВВЕДЕНИЕ

Лечение артериальной гипертензии (АГ) в нашей стране, прежде всего как социально значимой медицинской проблемы [1, 2] в связи с риском сердечно-сосудистых осложнений и смерти [3], проводится различными лекарственными средствами. Одним из них является эналаприл, широко применяемый в медицинской практике и доказавший свою высокую эффективность [4–7]. В связи со своей значимостью данное лекарственное средство включено в перечень ЖНВЛП [8].

Метаболизм эналаприла (Э), являющегося пролекарством, происходит путём гидролиза под действием фермента карбоксилэстеразы, приводя к образованию активной формы – эналаприлата (ЭТ) (рисунк 1) [9–14]. Генетический полиморфизм, лекарственные взаимодействия и другие аспекты являются важными факторами, определяющими изменчивость терапевтического ответа при применении препаратов, являющихся субстратами карбоксилэстеразы человека [13, 14]. В связи с этим оптимальным способом подбора индивидуальной дозы эналаприла для пациен-

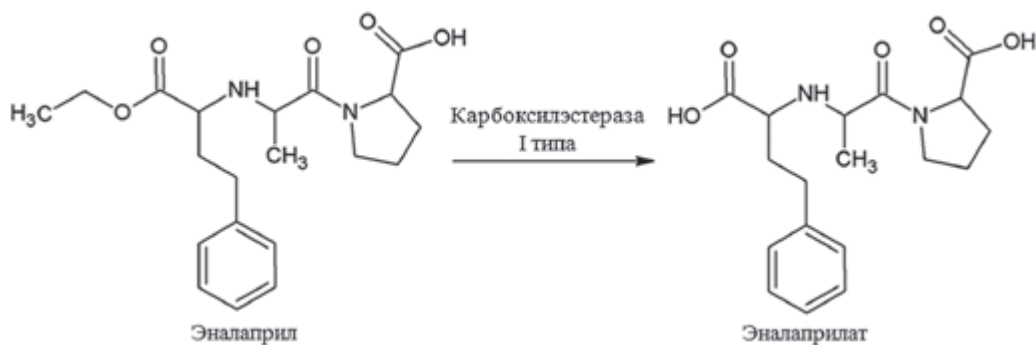


Рисунок 1. Схема метаболизма эналаприла под действием карбоксилэстеразы I типа

та в зависимости от его фенотипа является проведение терапевтического лекарственного мониторинга. Контроль артериального давления и титрование дозы препарата также являются достаточно эффективным способом персонализации терапии, однако реализация данного подхода требует больших временных затрат, чем непосредственное измерение концентрации эналаприла и эналаприлата в сыворотке крови человека.

В связи с этим целью нашей работы было создание экспрессной, чувствительной методики с максимально простой пробоподготовкой для определения эналаприла и эналаприлата в сыворотке крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на оборудовании фирмы Shimadzu (Япония), система ВЭЖХ Nexera LCMS-8040 (QQQ).

В работе использовали следующие реактивы: ацетонитрил (supergradient for UPLC, Panreac, Испания), муравьиная кислота (Fluka, for mass-spectrometry, США), деионизированная вода (электросопротивление – 18,2 МОм·см). Для приготовления калибровочных растворов использовали эналаприла малеат (1235300 USP, SigmaAldrich, США), эналаприлат (43301 SIGMA-ALDRICH, SigmaAldrich, США) и прометазина гидрохлорид (P4651 SIGMA, SigmaAldrich, США). Разделение осуществляли на колонке Synergi Polar RP, 50×2 мм, 4 мкм, 80 Å (Phenomenex, США), с универсальной предколонкой C18, 4×3,0мм (Phenomenex, США), при температуре 40 °С. Подвижная фаза состояла из элюента А [1% (об.) муравьиной кислоты/деионизированная вода] и элюента В [1% (об.) муравьиной кислоты/ацетонитрил]. Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 1, градиент по скорости потока представлен в таблице 2. Объем вводимой пробы – 2 мкл.

В качестве внутреннего стандарта использовали прометазин, как вещество, практически не применяемое в наши дни в клинической практике, что исключает возможность его нахождения в исследуемых образцах.

При ионизации использовали метод электро-распыления (ESI) в положительном режиме. Детектирование проводилось в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). В данном случае ионы-предшественники соответствовали протонированным молекулярным ионам, а именно: для Э – 377,20 m/z, для ЭТ – 349,30 m/z и для прометазина – 285,10 m/z. Параметры детектирования в режиме MRM⁺ и энергия соударений подобраны экспериментально и представлены в таблице 3. Время удерживания Э составляло около 1,04 мин, ЭТ – около 0,94 мин, прометазина – около 1,20 мин.

Разделение проводили в режиме градиентного элюирования. Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 1. Градиент по скорости потока представлен в таблице 2. Параметры детектирования в режиме MRM⁺ и энергия соударений подобраны экспериментально и представлены в таблице 3.

Таблица 1.

Градиент по составу подвижной фазы

Время анализа, мин	Объемная доля элюента В, %
0,00 → 0,20	5
0,20 → 0,21	5 → 37
0,21 → 0,90	37 → 39
0,90 → 0,91	39 → 47
0,91 → 1,45	47
1,45 → 1,86	47 → 100
1,86 → 2,10	100
2,10 → 2,20	100 → 5
2,20 → 3,00	5

Таблица 2.

Градиент по скорости потока

Время анализа, мин	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0,00 → 0,20	0,4
0,20 → 0,21	0,40 → 0,60
0,21 → 0,75	0,60
0,75 → 0,76	0,60 → 0,90
0,76 → 2,25	0,90
2,25 → 2,26	0,90 → 0,40
2,26 → 3,00	0,40

Таблица 3.

Параметры детектирования Э, ЭТ и прометазина в режиме MRM⁺

Вещество	Ион-предшественник, m/z	Фрагментный ион, m/z	Энергия соударений, В
Э	377,20	234,20	-35,0
ЭТ	349,30	117,10	-35,0
Прометазин	285,10	86,10	-20,0

Пробоподготовка осуществлялась путём осаждения белков сыворотки крови 50% раствором ТФУ в воде. Для этого к 400 мкл исследуемой сыворотки (либо 360 мкл интактной сыворотки крови человека с прибавлением 40 мкл рабочего стандартного раствора Э и ЭТ) добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта (прометазин с концентрацией 250 нг/мл), 200 мкл 50% раствора ТФУ в воде, встряхивали в течение 15 с на лабораторном шейкере типа «вортекс». Далее пробу центрифугировали 15 мин со скоростью 14000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в вials и помещали в автосамплер хроматографа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики проведена в соответствии с требованиями «Руководства по экспертизе лекарственных средств», том I [15].

При оценке селективности был проведён анализ 6 образцов интактной сыворотки крови человека из разных источников, образцов интактной сыворотки крови человека с прибавлением стандартного раствора Э в диапазоне концентраций 5–250 нг/мл, стандартного раствора ЭТ в диапазоне концентраций 5–250 нг/мл и раствора внутреннего стандарта прометазина с концентрацией 6,25 нг/мл.

На хроматограммах образцов интактной сыворотки крови человека отсутствовали пики с временами удерживания, соответствующими временам удерживания Э, ЭТ и прометазина (рисунки 2, 3).

Для проведения калибровки проводили анализ 9 образцов интактной сыворотки крови человека с прибавлением стандартных растворов до получения концентраций: 5 нг/мл, 15 нг/мл, 25 нг/мл, 50 нг/мл, 75 нг/мл, 100 нг/мл, 150 нг/мл, 200 нг/мл, 250 нг/мл для Э и ЭТ. Полученные калибровочные графики, а также уравнения прямых и коэффициенты корреляции приведены на рисунках 4, 5.

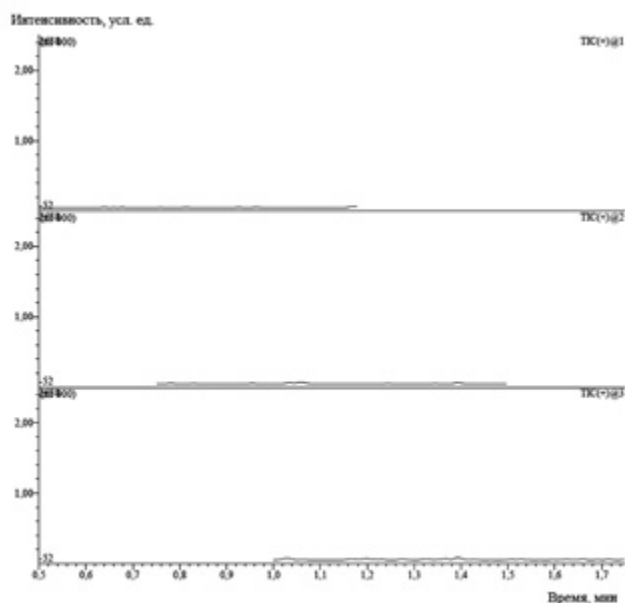


Рисунок 2. Хроматограмма образца интактной сыворотки

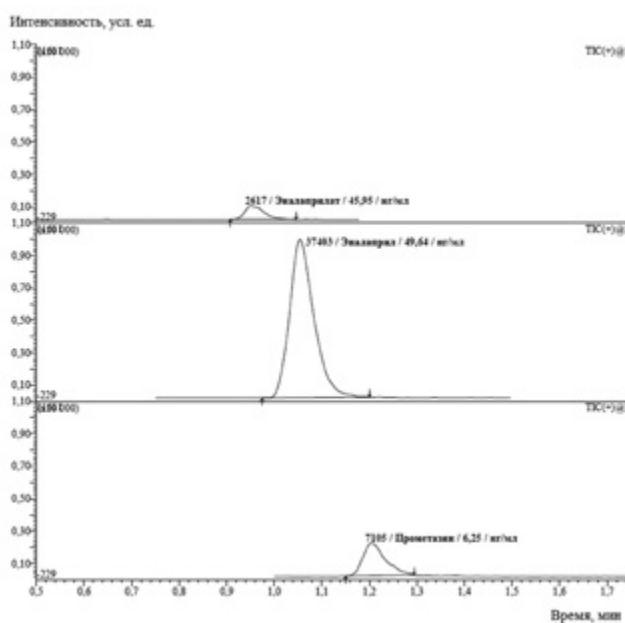


Рисунок 3. Хроматограмма образца интактной сыворотки крови человека с прибавлением стандартных растворов Э, ЭТ и прометазина

Полученные коэффициенты корреляции соответствовали норме (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в таблицах 4, 5.

При оценке точности и прецизионности проводили анализ 4 образцов интактной сыворотки крови человека с прибавлением стандартных растворов до получения концентраций: 5 нг/мл, 15 нг/мл, 100 нг/мл, 250 нг/мл для ЭТ и 5 нг/мл, 15 нг/мл, 100 нг/мл, 250 нг/мл

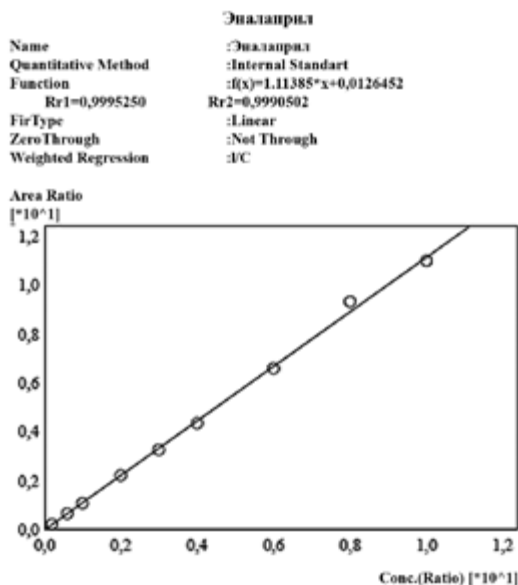


Рисунок 4. Калибровочный график для эналаприла от концентрации в сыворотке крови человека

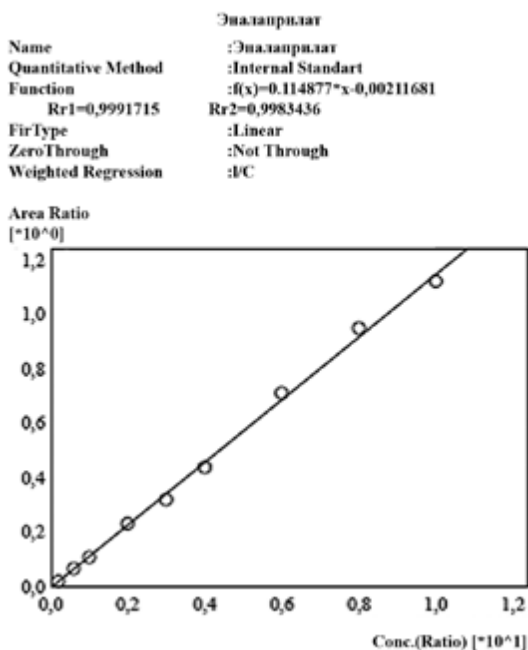


Рисунок 5. Калибровочный график для эналаприлата от концентрации в сыворотке крови человека

для Э. Анализ проводили в рамках 3 циклов, включавших по 5 образцов для каждого уровня концентраций. Точность и прецизионность определяли внутри аналитического цикла и между циклами. Были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %), приведенные в таблицах 4, 5.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной

погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20% для нижнего диапазона линейности, не более 15% для остальных точек).

Таблица 4.

Точность и прецизионность методики для ЭТ

введено (нг/мл)	Внутри цикла			Между циклами		
	найдено (нг/мл), среднее (n=5)	RSD, % (n=5)	E, %	найдено (нг/мл), среднее (n=15)	RSD, % (n=15)	E, %
5,00	5,07	10,09	1,44	5,20	7,53	3,93
15,00	16,10	3,44	7,35	15,58	5,42	3,88
100,00	96,89	4,71	-3,11	101,25	7,56	1,25
250,00	279,54	1,56	11,82	277,59	4,57	11,03

Таблица 5.

Точность и прецизионность методики для Э

введено (нг/мл)	Внутри цикла			Между циклами		
	найдено (нг/мл), среднее (n=5)	RSD, % (n=5)	E, %	найдено (нг/мл), среднее (n=15)	RSD, % (n=15)	E, %
5,00	4,98	6,35	-0,40	5,03	7,02	0,56
15,00	14,81	5,28	-1,24	15,24	3,49	1,63
100,00	101,24	3,52	1,24	104,61	7,44	4,61
250,00	262,16	5,25	4,86	265,74	5,46	6,30

При оценке влияния биологической матрицы на сигнал детектора при анализе Э, ЭТ и прометазина рассчитывали фактор матрицы как соотношение площади пика исследуемого вещества на хроматограмме образца сыворотки крови с добавлением стандартных растворов после осаждения белков (А) к площади пика исследуемого вещества на хроматограмме

образца, приготовленного с заменой сыворотки крови равным объёмом воды и с добавлением стандартных растворов Э, ЭТ и прометазина (Б). Эффект матрицы был определён на уровнях диапазона 5 нг/мл и 250 нг/мл для ЭТ, 5 нг/мл и 250 нг/мл для Э и 6,25 нг/мл для прометазина.

Степень извлечения Э, ЭТ и прометазина из сыворотки крови в процессе пробоподготовки рассчитывали как соотношение площади пика исследуемого вещества на хроматограмме образца сыворотки крови с добавлением стандартных растворов до осаждения белков (В) к площади пика исследуемого вещества на хроматограмме образца сыворотки крови с добавлением стандартных растворов после осаждения белков (А). Степень извлечения была определена на уровнях диапазона 15 нг/мл и 250 нг/мл для ЭТ, 15 нг/мл и 250 нг/мл для Э и 6,25 нг/мл для прометазина. Данные представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Оценка эффекта матрицы и степени извлечения при анализе

	Концентрация Э, нг/мл		Концентрация ЭТ, нг/мл		Концентрация прометазина, нг/мл
	5	250	5	250	
Эффект матрицы (А/В)	0,69	0,63	0,70	0,73	0,86
Степень извлечения (В/А)	0,56	0,68	0,81	0,86	0,24

Методика разрабатывалась таким образом, чтобы добиться максимально возможной степени извлечения для ЭТ при максимально простом и быстром процессе пробоподготовки. К сожалению, нами была отмечена низкая степень извлечения прометазина из образцов. Однако внутренний стандарт добавляется во все анализируемые пробы в равном количестве, что делает несущественным влияние степени извлечения на результаты анализов. В практической деятельности лаборатории достаточно удобно использовать одно и то же вещество в качестве внутреннего стандарта для определения широкого круга лекарственных веществ по разным методикам. При таком подходе существует возможность дополнительно контролировать состояние оборудования путём сравнения времён удерживания и площадей пиков прометазина на хроматограммах, полученных в разное время. Про-

метазин нами используется как внутренний стандарт при определении карбамазепина и карбамазепин-10,11-эпоксида [16]. Кроме того, нами было показано, что стандартный раствор прометазина имеет высокую стабильность и его концентрация не изменяется в течение 1 года в условиях хранения при температуре от 4 до 8 °С. Данные в таблице 6 свидетельствуют о том, что для всех трёх веществ наблюдается подавляющее влияние матрицы, тем не менее предложенная методика позволяет добиться желаемого нижнего предела количественного определения (нПКО) как для Э, так и для ЭТ.

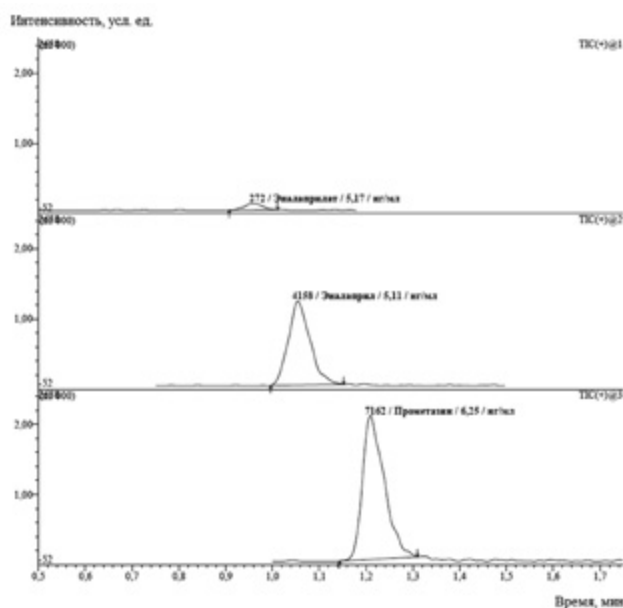


Рисунок 6. Хроматограмма образца сыворотки крови человека с содержанием Э и ЭТ на уровне нПКО

За нПКО методики принималась минимальная концентрация Э и ЭТ в сыворотке крови человека, для которой возможно определение Э и ЭТ со значениями RSD и E не более 20% в диапазоне линейной зависимости. нПКО методики составил 5 нг/мл для Э и ЭТ, при этом соотношение сигнал/шум имело значение более 10.

Стабильность исходного и рабочих стандартных растворов Э и ЭТ подтверждена при хранении в течение 6 месяцев при температуре -30 °С. Доказана кратковременная стабильность приготовленных проб в течение 24 часов при хранении в автосамплере хроматографа при температуре 4 °С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная методика заменила разработанную и опубликованную нами ранее [17] и в настоящее время применяется в ЦПМ ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского ДЗМ» для проведения фар-

макокинетических исследований с целью оптимизации фармакотерапии эналаприлом при заболеваниях сердечно-сосудистой системы (артериальная гипертензия, сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца и др.). Предложенная в настоящей работе методика отличается от предыдущей экспрессностью (время хроматографического анализа – 3 минуты), что обеспечивает экономию реактивов. Кроме того, использование метода внутреннего стандарта при количественном определении позволяет получать более стабильные результаты по сравнению с методом абсолютной калибровки даже в условиях снижения чувствительности детектора вследствие загрязнения.

Кроме того, широкий аналитический диапазон от 5 до 250 нг/мл как для Э, так и для ЭТ позволяет использовать данную методику для выполнения аналитического этапа исследований биоэквивалентности и оценки взаимозаменяемости препаратов эналаприла.

ЛИТЕРАТУРА

- G. Mancia et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC) // *Blood pressure*. 2013. V. 22. № 4. P. 193–278.
- G. Mancia et al. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document // *Blood pressure*. 2009. V. 18. № 6. P. 308–347.
- Prospective Studies Collaboration et al. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies // *The Lancet*. 2002. V. 360. № 9349. P. 1903–1913.
- И.Е. Чазова, Л.Г. Ратова. Комбинированная терапия у пациентов с артериальной гипертензией // *Системные гипертензии*. 2010. Т. 2. С. 6–10.
- Ю.Н. Беленков, Р.Г. Оганов. Кардиология: нац. рук. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 1232 с.
- Ю.Н. Беленков, В.Ю. Мареев, Ф.Т. Агеев. Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента в лечении сердечно-сосудистых заболеваний (Квинаприл и эндотелиальная дисфункция). – М.: Инсайт полиграфик, 2002. 86 с.
- M. Regulski et al. Chemistry and pharmacology of angiotensin-converting enzyme inhibitors // *Current pharmaceutical design*. 2015. V. 21. № 13. P. 1764–1775.
- Распоряжение Правительства Российской Федерации от 26.12.2015 № 2724-р.
- R. Thomsen et al. In vitro drug metabolism by human carboxylesterase 1: focus on angiotensin-converting enzyme inhibitors // *Drug Metabolism and Disposition*. 2014. V. 42. № 1. P. 126–133.
- S. Casey Laizure et al. The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? // *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2013. V. 33. № 2. P. 210–222.
- Y. Yang et al. Enzyme-mediated hydrolytic activation of prodrugs // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2011. V. 1. № 3. P. 143–159.
- V.K. Holenarsipur et al. Absorption and cleavage of enalapril, a carboxyl ester prodrug, in the rat intestine: in vitro, in situ intestinal perfusion and portal vein cannulation models // *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2015. V. 36. № 6. P. 385–397.
- J.C. Sanford et al. Regulatory effects of genomic translocations at the human carboxylesterase-1 (CES1) gene locus // *Pharmacogenetics and genomics*. 2016. V. 26. № 5. P. 197–207.
- X. Wang et al. CES1 genetic variation affects the activation of angiotensin-converting enzyme inhibitors // *The pharmacogenomics journal*. 2015. V. 16. № 3. P. 220–230.
- Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. / Под. ред. проф. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2013. 328 с.
- Т.А. Родина, Е.С. Мельников, А.В. Соколов, А.Б. Прокофьев, В.В. Архипов, А.А. Аксёнов, Д.Л. Поздняков. Экспресс-методика определения карбамазепина и карбамазепин-10,11-эпоксида методом ВЭЖХ-МС/МС // *Химико-фармацевтический журнал*. 2016. Т. 50. № 6. С. 52–56.
- Т.А. Родина, Е.С. Мельников, А.В. Соколов, С.А. Белков, Г.В. Раменская. Определение эналаприла и его активного метаболита эналаприлата в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС при персонализации фармакотерапии больных артериальной гипертензией // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015. Т. 78. № 10. С. 15–20.