

ФАРМАКОКИНЕТИКА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНАЛАПРИЛА И ЕГО АКТИВНОГО МЕТАБОЛИТА ЭНАЛАПРИЛАТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС ПРИ ПЕРСОНАЛИЗАЦИИ ФАРМАКОТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Т. А. Родина^{1, 2}, Е. С. Мельников³, А. В. Соколов^{1, 2}, С. А. Белков², Г. В. Раменская^{1, 3}

Разработана селективная, чувствительная и воспроизводимая методика количественного определения эналаприла и его активного метаболита эналаприлата в плазме крови человека методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Применён метод ионизации DUIS: одновременное использование электрораспыления (ESI) и химической ионизации при атмосферном давлении (APCI). Детектирование осуществляли в режиме положительной ионизации путём мониторинга множественных реакций (MRM). Пробоподготовку плазмы крови проводили путём осаждения белков ацетонитрилом. Расчёты при количественном определении проводили методом внешнего стандарта. Калибровочная кривая носила линейный характер в диапазоне концентраций 5 – 100 нг/мл для обоих исследуемых веществ. Разработанный метод может быть использован для подбора дозы эналаприла при терапевтическом лекарственном мониторинге.

Ключевые слова: эналаприл; эналаприлат; ВЭЖХ-МС/МС; персонализированная медицина; терапевтический лекарственный мониторинг.

ВВЕДЕНИЕ

Эналаприл (рис. 1, *а*) — лекарственное средство из группы ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента. В список ЖНВЛП включены таблетки эналаприла [2], препарат широко применяется для лечения артериальной гипертензии и хронической сердечной недостаточности [3, 4]. Эналаприл является пролекарством и сам по себе оказывает слабое антигипертензивное действие. Активный метаболит эналаприла — эналаприлат (рис. 1, *б*) — образуется в организме при гидролизе под действием эстераз печени. В связи с этим выраженность и длительность гипотензивного действия при приёме эналаприла во многом определяется скоростью его гидролиза до эналаприлата, которая может значительно варьировать у пациентов.

Средняя терапевтическая доза эналаприла — 2,5 – 20 мг/сут, биодоступность 40 %. Максимальная

концентрация эналаприла в крови достигается через 1 ч, эналаприлата — через 3 – 4 ч. Максимальная концентрация эналаприла и эналаприлата в плазме крови человека составляет 90,5 и 47,5 нг/мл, период полувыведения — 1,35 и 6,71 ч, соответственно [14]. При правильно подобранном режиме дозирования концентрация эналаприлата в плазме крови должна оставаться в рамках терапевтического диапазона, а клинический эффект сохраняется до 24 ч после приёма препарата.

Для обеспечения правильного подбора дозы и кратности приёма эналаприла целесообразно проводить оценку скорости его метаболизма у каждого больного [1]. Данную задачу можно решить путём непосредственного измерения концентраций эналаприла и эналаприлата в плазме крови до приёма препарата и спустя 4 ч, сравнивая затем полученные значения.

Среди современных аналитических методов определения эналаприла и эналаприлата в плазме или сыворотке крови человека большинство авторов отдаёт предпочтение ВЭЖХ-МС/МС ввиду высокой чувствительности и селективности метода [6, 7, 9, 10, 13]. В качестве способа пробоподготовки для образцов плазмы крови можно использовать осаждение белков ацетонитрилом [6, 7], жидкость-жидкостную экстракцию [6, 9, 10] и твердофазную экстракцию [13].

Осаждение белков плазмы ацетонитрилом представляет наибольший интерес с точки зрения простоты и скорости выполнения процедуры пробоподготовки. В исследовании [7] не удалось провести валида-

¹ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8.

² ГБУ здравоохранения г. Москвы Городская клиническая больница № 23 им. «Медсантруд» Департамента здравоохранения г. Москвы, Российская Федерация, 109240, Москва, ул. Яузская, д. 11.

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Российская Федерация, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8.
e-mail: evgueniy.melnikov@gmail.com

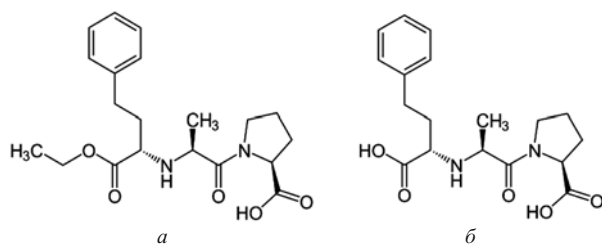


Рис. 1. Структурные формулы: а) эналаприла, б) эналаприлата.

цию методики согласно требованиям FDA [11]. В работе [6] удалось получить линейную калибровку в диапазоне 0,1 – 150 нг/мл и добиться $r = 0,99$ (используется весовой коэффициент $1/x^2$) для обоих аналитов, однако соотношение сигнал/шум на уровне предела количественного определения (ПКО) для эналаприлата составило 4,1 при использовании осаждения белков плазмы ацетонитрилом в качестве способа пробоподготовки.

Целью настоящего исследования является разработка методики одновременного количественного определения эналаприла и эналаприлата в плазме крови человека с помощью ВЭЖХ-МС/МС для проведения терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) и фенотипирования больных по скорости гидролиза эналаприла.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ проводили на оборудовании фирмы Shimadzu (Япония). Использовался жидкостный хромато-масс-спектрометр LCMS-8040 (система жидкостной хроматографии Nexera с тройным квадрупольным масс-спектрометром), укомплектованный системой ионизации DUIS, которая позволяет одновременно использовать 2 метода ионизации (электрораспыление (ESI) и химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)), системой градиентного элюирования, УФ-спектрофотометрическим детектором SPD-M20A с диодной матрицей (диапазон длин волн 190 – 800 нм), термостатом колонок СТО-20АС с диапазоном температур 4 – 90 °С.

В работе использовали следующие реактивы: ацетонитрил LiChrosolv® Reag. Ph Eur (для ЖХ), муравьиная кислота (Merck), деионизованная вода (удельное сопротивление — 18,2 Мом · см). Для приготовления

Таблица 1. Градиент состава подвижной фазы

Время анализа, мин	Объёмная доля элюента В, %
0,0 → 7,0	30 → 50
7,0 → 8,5	50
8,5 → 12,5	50 → 100
12,5 → 14,5	100
14,5 → 15,5	100 → 30
15,5 → 20,0	30

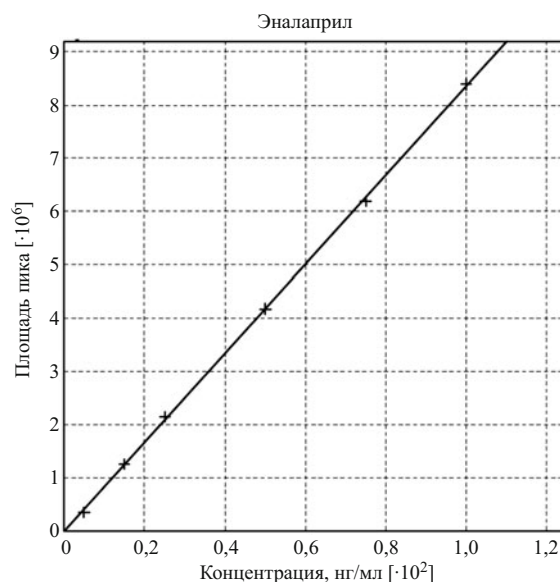


Рис. 2. Калибровочная прямая для эналаприла.

калибровочных растворов использовали эналаприла малеат (Fluka) и эналаприлата дигидрат (Fluka), отвечающие требованиям USP.

Разделение осуществляли на колонке Sinergi Polar RP, 4 мкм, 250 × 4,6 мм (Phenomenex, США) при температуре 40 °С. Подвижная фаза состояла из элюента А (1 % муравьиной кислоты / деионизованная вода) и элюента В (1 % муравьиной кислоты / ацетонитрил). Хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме элюирования, описанном в табл. 1. Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин. Объем вводимой пробы — 10 мкл.

При определении условий масс-спектрометрического детектирования в режиме сканирования полного ионного тока (scan⁺) были выбраны ионы-предшественники: для эналаприла 349,30 *m/z*, для эналаприлата 377,20 *m/z*, что соответствует протонированным молекулярным ионам исследуемых веществ. Затем в режиме сканирования фрагментных ионов (product scan⁺)

Таблица 2. Параметры детектирования эналаприла и эналаприлата в режиме MRM⁺

№ п/п	Ион предшественник, <i>m/z</i>	Фрагментный ион, <i>m/z</i>	Энергия соударений, В
Эналаприлат			
1	349,30	206,10	– 30,0
2		160,10	– 35,0
3		134,10	– 30,0
4		117,10	– 35,0
Эналаприл			
1	377,20	303,10	– 23,0
2		234,20	– 25,0
3		160,10	– 24,0
4		130,10	– 27,0
5		117,20	– 50,0

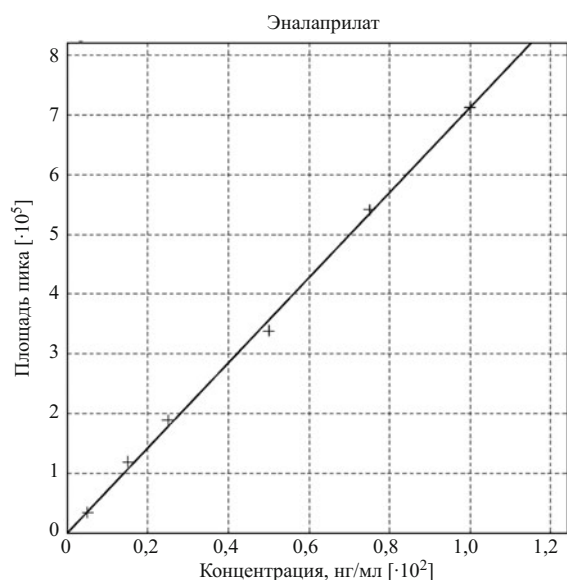
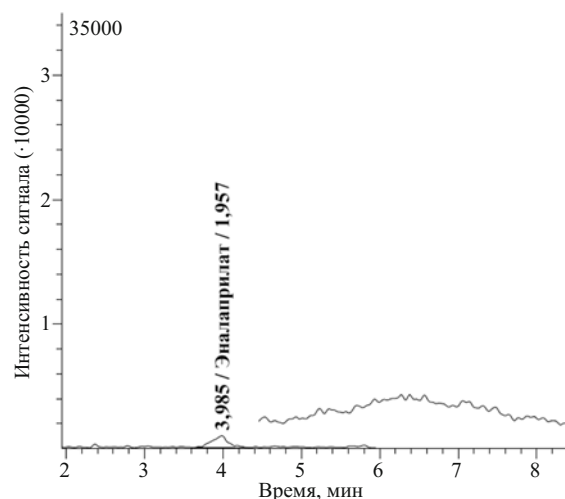


Рис. 3. Калибровочная прямая для эналаприлата.



Вещество	Время удержания, мин	Площадь пика	Концентрация, нг/мл
Эналаприлат	3,985	13946	1,957
Эналаприл	—	—	N.D. (Peak)

Рис. 4. Хроматограмма пробы плазмы крови пациента до приема внутрь лекарственного препарата энап.

были выбраны ионы, которые в дальнейшем использовались для мониторинга множественных реакций (MRM⁺). Энергия соударений подбиралась экспериментально. В табл. 2 представлены параметры детектирования в режиме MRM⁺.

Подготовку проб плазмы крови осуществляли путём осаждения белков. Для этого к 400 мкл плазмы добавляли 800 мкл ацетонитрила, встряхивали в течение 1 мин на шейкере типа “вортекс” V-3 (ELMI, Латвия), после чего центрифугировали 15 мин со скоростью 15000 об/мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5427. Надосадочную жидкость переносили в виалы и помещали их в автосамплер хроматографа.

Учитывая данные о фармакокинетике эналаприла и эналаприлата, количественное определение изучаемых веществ было решено проводить в диапазоне от 5 до 100 нг/мл. Для построения калибровочной кривой проводили подготовку проб и анализ образцов интакт-

ной плазмы с прибавлением стандартного раствора эналаприла и эналаприлата до достижения концентраций 5, 15, 25, 50, 75 и 100 нг/мл.

Аналитическая методика

Кислотно-основные свойства эналаприла и эналаприлата оказывают существенное влияние на выбор условий хроматографического разделения и ионизации при детектировании.

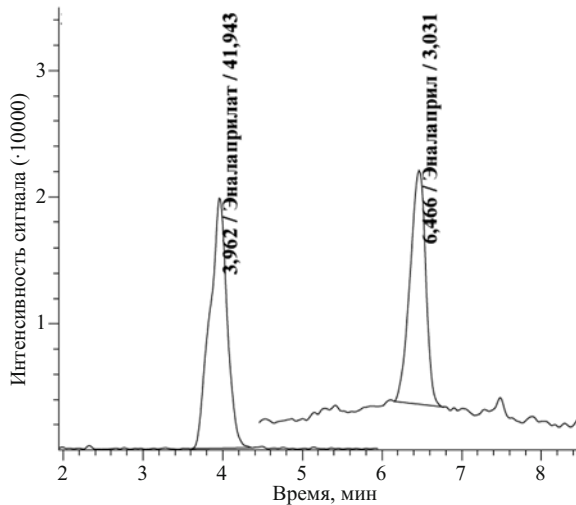
Введение в подвижную фазу различных добавок, называемых динамическими модификаторами, необходимо для изменения, а именно — улучшения хроматографического разделения. Произведен экспериментальный подбор динамического модификатора для обеспечения оптимального разделения и ионизации эналаприла и эналаприлата при совместном присутст-

Таблица 3. Правильность и прецизионность методики внутри аналитического цикла

Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл, среднее значение (n = 5)	S. D. (n = 5)	RSD, % (n = 5)	ε, %
Эналаприлат				
5,00	4,74	0,18	3,75	– 5,12
15,00	15,77	0,73	4,62	5,15
50,00	49,93	2,27	4,54	– 0,14
100,00	100,15	1,30	1,29	0,15
Эналаприл				
5,00	4,58	0,26	5,67	– 8,40
15,00	15,06	0,19	1,23	0,37
50,00	50,50	1,48	2,92	1,00
100,00	100,46	2,63	2,62	0,46

Таблица 4. Правильность и прецизионность методики между аналитическими циклами

Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл, среднее значение (n = 10)	S.D. (n = 10)	RSD, % (n = 10)	ε, %
Эналаприлат				
5,00	4,65	0,24	5,12	– 7,00
15,00	15,26	0,82	5,38	1,75
50,00	49,73	1,93	3,87	– 0,53
100,00	100,02	1,60	1,60	0,02
Эналаприл				
5,00	4,54	0,25	5,42	– 9,16
15,00	15,06	0,22	1,44	0,40
50,00	50,40	1,23	2,44	0,80
100,00	100,38	1,92	1,91	0,38



Вещество	Время удержания, мин	Площадь пика	Концентрация, нг/мл
Эналаприлат	3,962	298864	41,943
Эналаприл	6,466	253277	3,031

Рис. 5. Хроматограмма пробы плазмы крови пациента через 4 ч после приема внутрь лекарственного препарата энап.

вии. Наилучшие результаты достигнуты при добавлении к подвижной фазе муравьиной кислоты (1 % по объёму). При этом при отсутствии модификаторов не наблюдалось полного разделения исследуемых веществ. Соли муравьиной кислоты, как и она сама, являются летучими, кроме того, добавка кислот в случае ионизации электрораспылением важна для формирования правильной формы капли получаемого аэрозоля и, как следствие, улучшения ионизации веществ.

Эналаприл содержит в своей структуре карбоксильную и вторичную алифатическую аминогруппу, а в молекуле эналаприлата имеются 2 карбоксильных и вторичная алифатическая аминогруппа. В связи с этим оба соединения обладают как кислотными, так и основными свойствами, в зависимости от pH в растворе эти вещества могут существовать в форме катионов,

Таблица 5. Индивидуальные концентрации эналаприла и его активного метаболита эналаприлата в плазме крови пациентов до и через 4 ч после приема внутрь лекарственного препарата энап, таблетки 2,5 мг

Пациент	Концентрация в плазме, нг/мл			
	до приема энапа		через 4 ч после приема	
	эналаприл	эналаприлат	эналаприл	эналаприлат
1	отсутствует	ниже ПКО	ниже ПКО	41,974
2	ниже ПКО	11,915	5,134	21,504
3	отсутствует	7,957	ниже ПКО	23,692
4	ниже ПКО	7,875	ниже ПКО	8,757
5	отсутствует	7,116	ниже ПКО	17,970
6	ниже ПКО	33,264	15,902	24,750

анионов и цвиттер-ионов [8, 15]. Для улучшения ионизации электрораспылением в положительном режиме и, следовательно, увеличения чувствительности методики необходимо подавление диссоциации карбоксильных групп эналаприла и эналаприлата и смещение кислотно-основного равновесия в сторону протонирования аминогруппы для приобретения молекулой положительного заряда, что достигается при взаимодействии исследуемых соединений с муравьиной кислотой.

Более ярко выраженные кислотные свойства эналаприлата приводят к тому, что эффективность его ионизации и сигнал детектора примерно в 10 раз меньше по сравнению с эналаприлом. Предложенные условия анализа обеспечивают ПКО методики на уровне 5 нг/мл.

В процессе создания методики был произведен подбор неподвижной фазы. Колонка Synergi Polar RP с силикагелем, модифицированным фенильными радикалами, позволила достичь более качественного разделения, чем колонка Zorbax Eclipse XDB-C18 с силикагелем, модифицированным алкильным радикалами C18. Разрешение между пиками эналаприла и эналаприлата и удерживание эналаприлата увеличилось, уменьшилось размывание пиков. Данное явление можно объяснить тем, что фенильная неподвижная фаза более полярна по сравнению с фазой C18 и лучше сорбирует эналаприл и эналаприлат, содержащие в своей структуре полярные функциональные группы (рассчитанные значения $\log P$ эналаприла и эналаприлата 0,03 и $-0,09$, соответственно [15]). Существенно, что колонка Synergi Polar RP способна работать при pH 1,5, позволяя тем самым увеличить концентрацию муравьиной кислоты в подвижной фазе до 1 %.

Валидация методики

Валидация методики количественного определения эналаприла и эналаприлата в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС выполнена по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность (внутри цикла и между циклами), прецизионность (внутри цикла и между циклами), ПКО, перенос пробы, стабильность растворов [5, 11, 12].

Селективность методики оценивали при сравнении хроматограмм проб интактной (“чистой”) плазмы с прибавлением стандартных растворов эналаприла и эналаприлата с хроматограммами проб чистой плазмы. На хроматограмме пробы чистой плазмы не наблюдается пиков, соответствующих по временам удерживания эналаприлу и эналаприлату.

При оценке линейности проводили анализ 6 проб чистой плазмы с добавлением стандартного раствора эналаприла и эналаприлата до получения концентраций 5, 15, 25, 50, 75 и 100 нг/мл. Построены калибровочные графики для эналаприла (рис. 2) и эналаприлата (рис. 3). Уравнение калибровочной прямой для эналаприла имеет вид $y = 83568,3x$, коэффициент корреляции

ляции (r) составляет 0,99985, свободный член линейного уравнения не отличается от 0. Уравнение калибровочной прямой для эналаприлата имеет вид $y = 7125,53x$, коэффициент корреляции (r) составляет 0,99913, свободный член линейного уравнения не отличается от 0. Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанные по уравнениям линейной зависимости, укладываются в допустимые нормы отклонений ($\pm 20\%$ для нижней точки аналитического диапазона и $\pm 15\%$ для остальных точек).

При оценке правильности и прецизионности проводили анализ 4 образцов чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора эналаприла и эналаприлата до получения концентраций 5, 15, 50, 100 нг/мл. Анализ каждого раствора осуществляли по 5 раз в рамках 2 аналитических циклов. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε , %), приведенные в табл. 3 и 4.

ПКО методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За ПКО методики принимали минимальную концентрацию эналаприла и эналаприлата в плазме, для которой возможно их количественное определение со значениями RSD и ε не более 20 % в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения методики составил 5 нг/мл как для эналаприла, так и для эналаприлата.

Была подтверждена стабильность для стандартных растворов эналаприла и эналаприлата (при хранении раствора в течение 14 дней при температуре от 2 до 8 °C), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день при температуре 5 °C) на уровнях концентраций 5,00 и 100,00 нг/мл. Образцы выдерживали 3 цикла “замораживание – размораживание”. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10 %.

При последовательном анализе проб с концентрацией эналаприла и эналаприлата 100,00 нг/мл и чистой плазмы на хроматограмме чистой плазмы отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания эналаприлу и эналаприлату. Таким образом, перенос пробы отсутствовал.

Настоящая методика соответствует требованиям руководств по валидации [5, 11, 12] и превосходит аналогичные методики [6, 7] по таким характеристикам, как линейность ($r > 0,999$), правильность и прецизионность. Использование осаждения белков плазмы ацетонитрилом обеспечивает быстроту и высокую скорость проведения анализов.

Применение методики

Разработанная методика была применена для определения концентраций эналаприла и эналаприлата в плазме крови пациентов, проходивших лечение в Центре персонализированной медицины (ЦПМ) и прини-

мавших лекарственный препарат энап, таблетки 2,5 мг. Полученные данные приведены в табл. 5, типичные хроматограммы представлены на рис. 4 и 5.

Часть пациентов принимала энап постоянно ещё до поступления в ЦПМ, что объясняет обнаружение эналаприлата и эналаприла в пробах, отобранных перед приёмом препарата в клинике.

Индивидуальные значения и соотношение концентраций эналаприла и эналаприлата у пациентов через 4 ч после приёма энапа демонстрируют различия в скорости метаболизма эналаприла и являются ценной информацией для лечащего врача при выборе оптимальной дозы и кратности приёма препарата. Так, например, снижение концентрации эналаприлата при высоком уровне эналаприла через 4 ч после перорального приёма энапа 2,5 мг пациентом 6 (табл. 5), по-видимому, свидетельствует о низкой скорости метаболизма эналаприла, в связи с чем для рассматриваемого пациента требуется либо уменьшение разовой дозы, либо снижение кратности приёма, либо замена препарата. В тех случаях, когда наблюдается быстрый метаболизм (пациент 1), требуется увеличение кратности приёма препаратов эналаприла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика количественного определения эналаприла и его активного метаболита эналаприлата в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Методика селективна, имеет аналитический диапазон 5 – 100 нг/мл, относительное стандартное отклонение и относительная ошибка результатов измерений не превышает 5,42 и 9,16 %, соответственно.

Настоящая методика позволяет определять эналаприл и эналаприлат в плазме крови человека с целью проведения ТЛМ и фенотипирования пациентов по скорости гидролиза эналаприла.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Г. Кукес, С. В. Грачев, Д. А. Сычев, Г. В. Раменская, *Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины. Руководство для врачей*, ГЭО-ТАР-Медиа, Москва (2008).
2. *Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП) на 2015 год*. Утвержден Распоряжением Правительства РФ № 2782-р от 30 декабря 2014 г.
3. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 ноября 2012 г. № 708н г. Москва “Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при первичной артериальной гипертензии (гипертонической болезни)”.
4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 1554н “Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при сердечной недостаточности”.
5. *Руководство по экспертизе лекарственных средств*, Ч. I, А. Н. Миронов (ред.), Москва (2013).
6. M. Cheregi, F. Albu, S. Udrescu, et al., *J. Chromatogr. B*, **927**, 124 – 132 (2013).

7. E. Dias, B. Hachey, C. McNaughton, et al., *J. Chromatogr. B*, **937**, 44 – 53 (2013).
8. S. Gikas, F. Tsopelas, C. Giaginis, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**(3), 739 – 743 (2008).
9. O. Gonzalez, G. Iriarte, E. Rico, et al., *J. Chromatogr. B*, **878**(28), 2685 – 2692 (2010).
10. Q. Gu, X. Chen, D. Zhong, et al., *J. Chromatogr. B*, **813**(1 – 2), 337 – 342 (2004).
11. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U. S. Department of Health and Human Services, *Food and Drug Administration*, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), U. S. Government Printing Office, Washington DC (2001).
12. *Guideline on bioanalytical method validation*, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use, London, 2011.
13. J. Lee, J. Son, M. Lee, et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**(11), 1157 – 1162 (2003).
14. A. Portolés, A. Terleira, S. Almeida, et al., *Cur. Ther. Res.*, **65**(1), 34 – 46 (2004).
15. M. Remko, *Chem. Pap.*, **61**, 133 – 141 (2007).

Поступила 06.07.15

DETERMINATION OF ENALAPRIL AND ITS ACTIVE METABOLITE ENALAPRILATE IN HUMAN BLOOD PLASMA BY HPLC-MS/MS FOR PERSONALIZATION OF ANTIHYPERTENSIVE PHARMACOTHERAPY

T. A. Rodina^{1,2}, E. S. Melnikov^{3*}, A. V. Sokolov^{1,2}, S. A. Belkov², and G. V. Ramenskaya^{1,3}

¹ Scientific Center for Expertise of Medical Products, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Petrovskii bul. 8, Moscow, 127051 Russia.

² Moscow Municipal Clinical Hospital No. 23, ul. Yauzskaya 11, Moscow, 109240 Russia.

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8, Moscow, 119991 Russia.

* e-mail: evgueniy.melnikov@gmail.com

A selective, sensitive and reproducible method has been developed for the quantitative determination of enalapril and its active metabolite enalaprilate in human blood plasma by reverse-phase high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) detection. The method of double ionization (DUIS) is employed that combines electrospray ionization (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) techniques. The MS detection is performed in the positive ion mode by multiple reactions monitoring (MRM). The sample preparation is carried out using plasma protein precipitation with acetonitrile. Quantification is performed with respect to an external standard. The calibration curve is linear within a concentration range of 5 – 100 ng/mL for both enalapril and enalaprilate. The proposed method can be used for selecting a dose of enalapril in therapeutic drug monitoring.

Keywords: enalapril; enalaprilate; HPLC-MS/MS; personalized medicine; therapeutic drug monitoring.