

# ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРИНДОПРИЛА И ПЕРИНДОПРИЛАТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ: РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ

Е.С. Степанова\*, Л.М. Макаренкова, С.С. Барсегян, кандидат  
фармацевтических наук, В.В. Чистяков, доктор фармацевтических наук

Российский университет дружбы народов:

Российская Федерация, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

**Введение.** Для профилактики и лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы используют препараты-ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), в частности, периндоприл. Для подтверждения качества воспроизведенных препаратов необходима методика совместного определения самого действующего вещества, а также его активного метаболита периндоприлата.

**Цель** исследования – создание простой, надежной и воспроизводимой методики совместного изолирования периндоприла и периндоприлата из плазмы крови и их количественного определения при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС).

**Материал и методы.** В работе использовали субстанцию периндоприла эрбумина, стандарт периндоприлата и эналаприла малеат в качестве внутреннего стандарта. Исследование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Dionex Ultimate 3000» с масс-детектором Bruker micrOTOF-QII на картриджах для твердофазной экстракции (ТФЭ) C18-500мг «Isolute». Обработку хроматограмм и построение калибровочной кривой проводили в автоматическом режиме с помощью программы Quant Analysis.

**Результаты.** Разработана и валидирована высокоселективная методика совместного выделения и количественного определения периндоприла и периндоприлата в плазме крови с использованием ТФЭ на картриджах C18 и ВЭЖХ с МС-детектированием. Общее время хроматографического анализа – 6 мин. Нижние пределы количественного определения периндоприла и периндоприлата в плазме крови составляют 0,4 и 1,5 нг/мл соответственно.

**Заключение.** Разработанная методика пригодна для фармакокинетических исследований, определения биодоступности и биоэквивалентности препаратов на основе периндоприла.

**Ключевые слова:** ингибиторы АПФ, периндоприл, периндоприлат, твердофазная экстракция, ВЭЖХ-МС, валидация, фармакокинетика.

\*E-mail: stepanova\_25@inbox.ru

## ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), заболевания сердечно-сосудистой системы – одна из основных причин смертности больных во всем мире [1]. Профилактику и лечение данных заболеваний проводят с применением лекарственной терапии. Периндоприл (П) – представитель класса препаратов-ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) является пролекарством, в результате его метаболизма образуется активный метаболит периндоприлат (ПТ). Основной эффект ПТ связан с ингибированием ангиотензин-превращающего фермента и блокированием образования ангиотензина II из ангиотензина I [2]. Снижение уровня ангиотензина II приводит к гипотензивному эффекту.

Для подтверждения качества воспроизведенных препаратов П важно количественное определение в плазме крови самого действующего вещества и его активного метаболита ПТ. В литературе приведена методика количественного анализа П в плазме крови с

использованием жидкостно-жидкостной экстракции [3]. Совместное извлечение П и ПТ жидкостно-жидкостной экстракцией невозможно вследствие различий их физико-химических свойств. Описаны методики одновременного изолирования П и ПТ с использованием твердофазной экстракции (ТФЭ) [4–6]. Однако при применении дорогостоящих картриджей с гидрофильно-липофильным сорбентом (HLB) [4–6] стоимость исследований резко увеличивается.

Целью работы было создание достаточно простой, надежной и воспроизводимой методики совместного изолирования П и ПТ из плазмы крови и их количественного определения при помощи ВЭЖХ-МС.

При разработке методики было решено использовать картриджи для ТФЭ с сорбентом C18, ВЭЖХ-МС анализ осуществлять в режиме регистрации положительных ионов, применимом в исследованиях фармакокинетики и биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов. Поскольку метод ТФЭ с последующим упариванием представляет собой многоступенчатый процесс, для снижения риска возникновения случайных ошибок воспользовались методом внутреннего стандарта.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали субстанцию периндоприла эрбумина (серия № 061107349, Химфарм, Казахстан), стандарт периндоприлата (примесь периндоприла Б стандарт, 95,2%, Mfg. Glenmark Generics Ltd), эналаприла малеат (серия № 20413, Dr Ehrenstorfer) в качестве ВС.

Работа выполнялась на оборудовании Центра коллективного пользования Российского университета дружбы народов. Исследование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Dionex Ultimate 3000» с масс-детектором Bruker micrOTOF-QII. Выделение аналитов из плазмы крови проводили на картриджах для ТФЭ С18-500 мг «Isolute». Обработку хроматограмм и построение калибровочной кривой осуществляли в автоматическом режиме с помощью программы QuantAnalysis, входящей в пакет Bruker Compass 3.2.

Хроматографирование выполняли при следующих условиях: колонка Zorbax SB C18 5 4,6×150 мм, элюент – 0,2% водный раствор муравьиной кислоты и 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле в соотношении 70:30, изократический режим элюирования, поток подвижной фазы – 0,8 мл/мин, объем вводимой пробы – 10 мкл. В этих условиях время удерживания ПТ составило 2,2 мин, ВС – 4,1 мин, П – 4,9 мин. Условия масс-детектирования: ионизация электрораспылением, напряжение на капилляре – 500 В, температура источника – 220°C, расход осушающего газа – 7 л/мин, давление распыляющего газа – 3 бар. Регистрация положительных ионов: ПТ – в режиме MRM, энергия соударений – 8 eV, газ фрагментации – аргон, целевой переход ПТ [M+H]<sup>+</sup> m/z 341,2→170,1; в режиме MS – целевые ионы [M+H]<sup>+</sup> П – m/z 369,2; эналаприла – m/z 377,2.

Стандартные растворы периндоприла эрбумина готовились в мерных колбах путем последовательного разведения матричного раствора (0,1 мг/мл) водой до концентраций: 25,0; 50,0; 1250,0; 3750,0; 5500,0; 7500,0 нг/мл. Стандартные растворы ПТ готовили в мерных колбах последовательным разведением матричного раствора (0,1 мг/мл) водой до концентраций: 75,0; 225,0; 625,0; 1250,0; 1875,0; 2500,0 нг/мл.

Стандартный раствор эналаприла в качестве ВС готовили разведением матричного раствора (0,1 мг/мл) водой до концентрации 1,5 мкг/мл.

Калибровочные стандарты и образцы контроля качества (QC) готовили путем добавления по 10 мкл соответствующего стандартного раствора П и ПТ к 480 мкл плазмы крови. Диапазон концентраций выбирался на основании данных литературы [4]. Пересчет концентрации с соли периндоприла эрбумина на основании периндоприла проводили по формуле:

$$C_{\text{пер.о}} = \frac{368,5 \cdot C_{\text{пер}}}{441,6},$$

где  $C_{\text{пер.о}}$  – концентрация периндоприла основания (далее – периндоприл П);  $C_{\text{пер}}$  – концентрация периндоприла эрбумина; 368,5 и 441,6 – молярные массы периндоприла основания и периндоприла эрбумина соответственно.

Пробоподготовку осуществляли по следующей методике: исследуемые вещества извлекали из плазмы крови методом ТФЭ. В пробирку Эппендорфа 1,5 мл отбирали 500 мкл плазмы, добавляли 10 мкл раствора ВС и 250 мкл раствора аммония ацетата 0,05 моль/л. Встряхивали на вихревой мешалке 30 с, центрифугировали 4 мин при 28207g. Перед нанесением плазмы картридж для ТФЭ кондиционировали последовательно 1 мл метилового спирта и 2 мл воды. Затем наносили плазму и промывали картридж 2 мл 0,01 моль/л раствора аммония ацетата. Аналиты смывали в чистую пробирку 2 мл метилового спирта. Метиловый спирт упаривали на испарителе-концентраторе «Concentrator plus» 40 мин в вакууме, а затем под током воздуха при нагревании до 45°C досуха. Сухой остаток перерастворяли в 100 мкл подвижной фазы.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Калибровочные кривые были построены по 6 концентрационным уровням. Калибровочная кривая П находилась в диапазоне 0,4–125,2 нг/мл, ПТ – 1,5–50,0 нг/мл. Коэффициенты корреляции калибровочных кривых составили >0,99. Калибровочные зависимости с нормированием 1/x описывались линейными уравнениями  $y=1,272110 \cdot x+0,001768$  и  $y=0,148713 \cdot x-0,004158$  для П и ПТ соответственно. Точность концентраций

Таблица 1

#### МЕЖСЕРИЙНАЯ ТОЧНОСТЬ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ МЕТОДИКИ

| Показатель | Периндоприл                  |             |                      | Периндоприлат                |             |                      |
|------------|------------------------------|-------------|----------------------|------------------------------|-------------|----------------------|
|            | истинная концентрация, нг/мл | точность, % | воспроизводимость, % | истинная концентрация, нг/мл | точность, % | воспроизводимость, % |
| QC 1       | 0,4                          | 106,9       | 10,5                 | 1,5                          | 111,1       | 5,1                  |
| QC 2       | 0,8                          | 108,3       | 13,9                 | 4,5                          | 98,5        | 9,8                  |
| QC 3       | 62,6                         | 103,1       | 3,7                  | 25,0                         | 100,2       | 7,8                  |
| QC 4       | 93,9                         | 99,3        | 8,9                  | 37,5                         | 102,5       | 6,2                  |

Таблица 2

**МАТРИЧНЫЕ ФАКТОРЫ АНАЛИТОВ И ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА,  
НОРМАЛИЗОВАННЫЕ МАТРИЧНЫЕ ФАКТОРЫ АНАЛИТОВ**

| Образцы с содержанием        | МФ <sub>П</sub> | МФ <sub>ПТ</sub> | МФ <sub>ВС</sub> | НМФ <sub>П</sub> | НМФ <sub>ПТ</sub> |
|------------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 0,8 нг/мл П и 4,5 нг/мл ПТ   | 1,13            | 1,40             | 1,24             | 0,92             | 1,14              |
| 93,9 нг/мл П и 37,5 нг/мл ПТ | 0,97            | 1,32             | 1,23             | 0,79             | 1,07              |

калибровочных значений не превышала  $\pm 15\%$  ( $\pm 20\%$  – для LLOQ, нижней точки калибровочной зависимости).

Внутрисерийная и межсерийная оценка точности и воспроизводимости методики проводилась на образцах QC 4 концентрационных уровней, соответствующих LLOQ, (2-) 3-кратному значению LLOQ, 50 и 75% от ULOQ – верхней точки калибровочной зависимости. В каждой серии готовили по 4 образца QC.

Внутрисерийная воспроизводимость для образцов QC не превышала 15% (20% – для QC1), внутрисерийная точность полученных значений укладывалась в диапазон 85–115% (80–120% для QC 1) для П и ПТ. Полученные результаты (табл.1) демонстрируют, что разработанная методика удовлетворяет критериям точности и воспроизводимости.

Пределы обнаружения П и ПТ составили 0,12 и 0,8 нг/мл соответственно. При этом отношение сигналов аналитов к шуму базовой линии составили 5:1 для П и ПТ.

Эффект влияния матрицы и извлечение изучали на уровнях концентрации соответствующих QC2 и QC3. В исследовании использовали 3 типа образцов: образцы А (растворы стандартов в подвижной фазе), образцы Б (растворы стандартов в супернатанте) и образцы QC. Образцы А и Б готовили путем добавления к 70 мкл подвижной фазы или супернатанта, полученного после ТФЭ бланковой пробы матрицы, соответственно по 10 мкл стандартных растворов П, ПТ и ВС. Значения матричных факторов (МФ=площадь пика в образце Б/площадь пика в образце А) отдельно для аналитов и ВС, а также нормализованный матричный фактор (НМФ=  $\frac{\text{МФ}_{\text{аналит}}}{\text{МФ}_{\text{ВС}}}$ ) представлены в табл. 2.

Извлечения (И) оценивались и рассчитывались отдельно для аналитов и ВС по формуле:  $\text{И} = \frac{\text{площадь пика в образце QC}}{\text{площадь пика в образце Б}} \cdot 100\%$ . Степень извлечения П составила: 73,6% – на уровне QC 2 и 84,1% – на уровне QC 3. Степень извлечения ПТ составила: 44,7 и 51,2% – на уровне QC 2 и QC 3 соответственно. Извлечение ВС колебалось в пределах 97,6–80,3%.

При установлении стабильности в автосамплере сравнивали найденные отношения площадей пиков аналита и ВС в одних и тех же пробах, проанализированных сразу после процедуры пробоподготовки и через 15 ч выдерживания их в термостатируемом автосамплере при температуре 10°C. Влияние факторов на стабильность концентрации П и ПТ в готовых пробах более 13 %.

Таким образом, методика отвечает всем требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам в части селективности, линейности, точности и воспроизводимости [7].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена простая и специфичная ВЭЖХ-МС методика определения периндоприла и периндоприлата в плазме крови с использованием ТФЭ на картриджах С18, которая позволяет одновременно выделять и количественно анализировать 2 аналита. Общее время хроматографического анализа составляет 6 мин. Методика высокоселективна (масс-спектрометрическое детектирование в режиме регистрации положительных ионов протонированного молекулярного иона периндоприла и фрагмента молекулы периндоприлата в режиме МС/МС) и чувствительна, нижние пределы количественного определения периндоприла и периндоприлата в плазме крови составляют 0,4 и 1,5 нг/мл соответственно. Методика пригодна для фармакокинетических исследований, определения биодоступности и биоэквивалентности препаратов на основе периндоприла.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Cardiovascular diseases (CVDs): Fact sheet (Electron. resource). World Health Organization. Reviewed June 2016. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (date of the application 7.08.2016).
2. Периндоприл: инструкция, применение и формула (Электронный ресурс). РАС: Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. (Perindopril: instruction, the use and formula (Electron. resource). Register of medicines: Encyclopedia of medicines and pharmaceutical products range. URL: [http://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_1719.htm](http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1719.htm) (date of the application 7.08.2016) (in Russian).
3. Ramakrishna V.S. Nirogi, Vishwottam N. Kandikere, Manoj Shukla Santosh Maurya, Prashanth Komameni. High-throughput quantification of perindopril in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2006; 20: 1864–70.
4. Deepak S.Jain, Gunta Subbaiah, Mallika Sanyal, Umesh C. Pande, Pranav Shrivastav. First LC–MS/MS electrospray ionization validated method for the quantification of perindopril and its metabolite perindoprilat in human plasma and its application to bioequivalence study. J. Chromatogr. B, 2006; 837: 92–100.
5. Georgakakou S., Kazanis M., Panderi I. Hydrophilic interaction liquid chromatography/positive ion electrospray ionization mass spectrometry method for the quantification of perindopril and its main metabolite in human plasma. Anal. Bioanal. Chem., 2010; 397: 2161–70.
6. Красных Л.М., Смирнов В.В., Егоренков Е.А., Василенко Г.Ф., Деметьев С.П., Раменская Г.В. Сравнительное изучение фармакокинетики периндоприла и его метаболита с помощью разработанного метода ВЭЖХ/МС. Вестник НЦЭСМП, 2015; 1: 21–5. (Krasnykh L.M., Smirnov V.V., Egorenkov E.A., Vasilenko G.F., Dement'ev S.P., Ramenskaja G.V. Comparative study of perindopril and perindopril metabolite pharmacokinetics using the HPLC/MS method. Vedomosti NTSESMP, 2015; 1: 21–5) (in Russian).
7. Guideline on bioanalytical method validation. European medicines agency, 2011.

Поступила 14 октября 2016 г.

## SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PERINDOPRIL AND PERINDOPRILATE IN PLASMA: DEVELOPMENT AND VALIDATION OF TECHNIQUES

E.S. Stepanova; L.M. Makarenkova; S.S. Barsegyan, PhD; V.V. Chistyakov, PhD

*Peoples' Friendship University of Russia; 6, Miklukho-Maklai St., Moscow 117198, Russian Federation*

### SUMMARY

**Introduction.** Angiotensin-converting enzyme inhibitors, perindopril in particular, are used to prevent and treat cardiovascular diseases. To confirm the quality of generic drugs, there is a need for techniques for the simultaneous determination of the active substance itself and its active metabolite perindoprilate.

**Objective:** to develop a simple, reliable, and reproducible technique for simultaneous isolation of perindopril and perindoprilate from plasma and for their quantification using high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS).

**Material and methods.** The investigation used the substance perindopril erbumine and the standard perindoprilate and enalapril maleate as an internal standard. The investigation was conducted on a Dionex Ultimate 3000 HPLC with a Bruker micrOTOF-QII mass detector on cartridges for solid-phase extraction (SPE) using an Isolute C18-500 mg column. Chromatograms were processed and a calibration curve was constructed automatically by the Quant Analysis program.

**Results.** A highly selective technique for simultaneous isolation and quantitative determination of perindopril and perindoprilate in plasma, by using SPE on C18 cartridges and HPLC-MS detection, was developed and validated. The total time of chromatographic analysis was 6 min. The lower limits for quantitative determination of perindopril and perindoprilate in plasma are 0.4 and 1.5 ng/ml, respectively.

**Conclusion.** The developed technique is suitable for pharmacokinetic studies and determination of the bioavailability and bioequivalence of perindopril-based drugs.

**Key words:** angiotensin-converting enzyme inhibitors, perindopril, perindoprilate, solid-phase extraction, high performance liquid chromatography-mass spectrometry, validation, pharmacokinetics.