

## 血浆中卡托普利及其二硫键代谢物总浓度的测定\*

钟大放 李雪庆 王爱民 陈笑艳

(沈阳药科大学药物代谢与药物动力学实验室, 沈阳 110015)

**摘要** 为测定血浆中卡托普利及其二硫键代谢物总浓度, 以适应临床进行血药浓度监测。用高效液相色谱方法。样品中卡托普利二聚体及卡托普利与氨基酸、血浆蛋白的二硫键结合物采用  $\text{NaBH}_4$  还原, 释放出卡托普利原形, 经液-液提取纯化后, 以邻苯二甲醛及 *D*-苯丙氨酸进行衍生化。选用反相 HPLC 法, 荧光检测。此法线性范围为  $5 \sim 300 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 最低检测限为  $5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。用本法测定了多名高血压病患者血浆中卡托普利及其二硫键代谢物的总含量, 结果证明此法灵敏度高。

**关键词** 卡托普利; 高效液相色谱法; 邻苯二甲醛

近年来对卡托普利体内和体外的代谢研究表明, 该药在血液中以单体原形、二硫键二聚物、与半胱氨酸或谷胱甘肽的二硫键结合物以及与血浆白蛋白的二硫键结合物等多种形式存在。据报道<sup>[1]</sup>, 卡托普利的这些二硫键结合物可以作为该药的储备, 在体内可逆地释放卡托普利单体而发挥治疗作用; 然而, 若体内卡托普利二硫键代谢物的浓度过高则可产生肾毒性。关于体液中卡托普利的测定方法包括气相色谱法(GC)<sup>[2]</sup>, 气相色谱-质谱法(GC/MS)<sup>[3]</sup>, 酶免疫法<sup>[4]</sup>, 高效液相色谱法(HPLC)<sup>[5~8]</sup>等。测定血浆中总卡托普利含量(卡托普利及其二硫键结合物的总浓度)的方法曾报道<sup>[6~8]</sup>以三丁基膦为还原剂, 将卡托普利二硫键结合物还原为单体, 再以对-溴苯乙酰溴(*p*-BPB)或 *N*-(3-苄基)马来酰亚胺(NPM)衍生化, 进行测定。

为适应临床药物监测, 本文建立了测定血浆中卡托普利及其二硫键代谢物总浓度的高效液相色谱方法。

## 实 验 部 分

## 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(包括 LC-10AD 泵, RF-

535 荧光检测器, C-R6A 数据处理机, 均为日本岛津公司产品); LD5-2A 离心沉淀器(北京医用离心机厂), HY-2 往复振荡器(深圳天南海北实业有限公司), DGF30/7IA 电热鼓风干燥箱(南京实验仪器厂)。

卡托普利纯品( $>99\%$ , 上海施贵宝公司); 吠塞米纯品(沈阳药科大学药物分析研究室提供); 邻苯二甲醛(OPA)、*D*-苯丙氨酸、EDTA 二钠盐、硼酸(德国 E. Merck 公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 山东禹王化学试剂厂); 重蒸馏水(本室自制), 其余试剂均为分析纯。

## 2 分析方法

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Hypersil  $\text{C}_{18}$  不锈钢柱( $5 \mu\text{m}$  粒径,  $200 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm ID}$ )(中国科学院大连化学物理研究所国家色谱研究中心); 流动相: 甲醇—乙腈— $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  缓冲液( $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 6.4)(30:30:135, *v/v/v*); 流速:  $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 荧光检测激发波长为 235 nm, 发射波长为 440 nm; 柱温为室温。

**2.2 溶液配制** 卡托普利二聚物按文献方法<sup>[9]</sup>合成、纯化, 以甲醇稀释得 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 3.0, 6.0  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的标准系列溶液(按卡托普利单体浓度计算)。取吠塞米纯品配成  $4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  的甲醇溶液作为内标液。NaBH<sub>4</sub> 溶液( $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 配制。衍生化试剂: a.  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  *D*-苯丙氨酸溶

液以  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸配制; b.  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  OPA 的甲醇溶液; a 与 b 以 1:1 体积比混合, 室温放置 15 min 后备用, 该混合物于  $4^\circ\text{C}$  保存可稳定 3 d。硼酸缓冲液 ( $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 用  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 溶液调 pH 至 9.2。以上溶液均置冰箱 ( $4^\circ\text{C}$ ) 保存。

**2.3 血浆样品的预处理** 取血浆样品 1 ml, 置带塞玻璃试管中, 加入内标溶液  $50 \mu\text{l}$  及新配制的  $\text{NaBH}_4$  溶液  $50 \mu\text{l}$ , 混匀, 置  $55^\circ\text{C}$  烘箱中反应 30 min, 水浴冷却, 加入  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液  $100 \mu\text{l}$ , 混匀, 加入二氯甲烷 3 ml, 试管加塞, 水平往复振荡 20 min ( $240 \text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 离心 10 min ( $3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 转移有机相至另一带塞试管中, 加入硼酸缓冲液  $250 \mu\text{l}$ , 同上条件往复振荡 3 min, 离心 3 min, 吸取水相  $150 \mu\text{l}$ , 加入 EDTA 二钠盐溶液 ( $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $10 \mu\text{l}$  及衍生化试剂  $10 \mu\text{l}$ , 混匀, 室温 ( $15 \sim 25^\circ\text{C}$ ) 放置 20 min, HPLC 进样  $50 \mu\text{l}$ 。

**3 分析方法确证**

**3.1 专属性** 在选定的色谱条件下, 将空白血浆样品与含药血浆样品测得的色谱图 (图 1) 比较, 表明内源性物质不干扰卡托普利衍生物及内标物的分析, 且峰形和分离度较好。内标物和卡托普利衍生物的保留时间分别为 7.4 min 和 12.2 min。

**3.2 线性范围** 分别取空白血浆 1 ml, 置带塞试管中, 依次加卡托普利二聚物标准溶液各  $50 \mu\text{l}$ , 混匀, 按“血浆样品的预处理”操作, 依法测定。以卡托普利浓度为横坐标, 分析物与内标物峰高之比为纵坐标, 用加权最小二乘法 (权重系数为  $1/C^2$ ) 进行回归运算, 求得血浆中总卡托普利含量, 结果见表 1。线性范围为  $5 \sim 300 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 以卡托普利计算的最低检测量 (LLQ) 为  $5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

**3.3 精密度与准确度** 取空白血浆, 按“线性范围”项下方法制备质量控制 (QC) 样品, 分别配制卡托普利二聚物溶液为 10, 50, 300  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  (浓度以卡托普利单体计算), 依法测定, 重复 3 个分析批 (Run), 并与标准曲线同时进行。以当日的标准曲线计算 QC 样品的浓

度, 并求得本法的精密度与准确度, 结果见表 2。

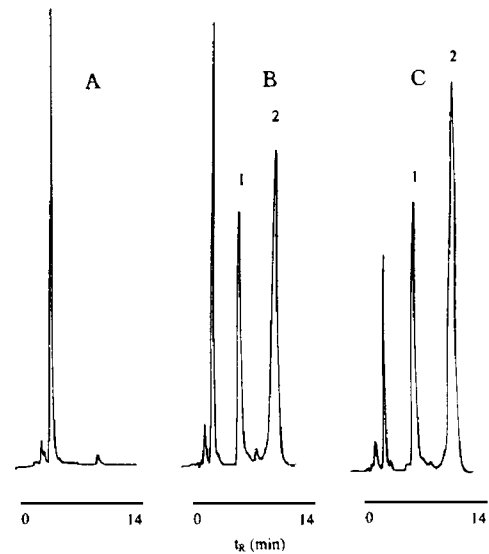


Fig 1 Typical chromatograms of captopril in plasma. A. Blank plasma; B. Plasma spiked with captopril disulfide ( $150 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ); C. Plasma sample of a patient with long-term therapy (1 h after oral administration of captopril 31.25 mg). 1. Internal standard (furosemide); 2. Captopril derivative.

**Tab 1 Parameters of standard curves for total captopril ( $Y = a + bX$ )**

Run	Intercept ( $\times 10^{-3}$ )	Slope ( $\times 10^{-3}$ )	$\gamma$
1	0.731	5.490	0.9953
2	3.694	4.618	0.9951
3	-0.241	4.679	0.9930

**Tab 2 The precision and accuracy of determination of total captopril in plasma**

Concentration ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Within-day ( $n = 6$ )			Day-to-day ( $n = 18$ )		
	s	RSD%	RE%	s	RSD%	RE%
10.0	0.5	5.1	2.8	0.7	7.4	1.2
50.0	1.7	3.4	1.5	2.8	5.7	1.5
300.0	15.4	5.1	-2.0	25.8	8.6	3.3

**4 临床应用**

应用本法分别对两名肾功能衰竭伴有高血压症状的患者单剂量口服卡托普利和两名长期

服用卡托普利的单纯性高血压患者血样进行了测试。受试者均于清晨空腹服药,于服药前及服药后指定时间由前臂静脉采血 3 ml 入肝素

化试管中,离心,分取血浆置冰箱(-20℃)保存直至分析。结果见表 3。

**Tab 3 Plasma concentrations of total captopril ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) in two patients with single dose and two patients with long-term oral administration of captopril**

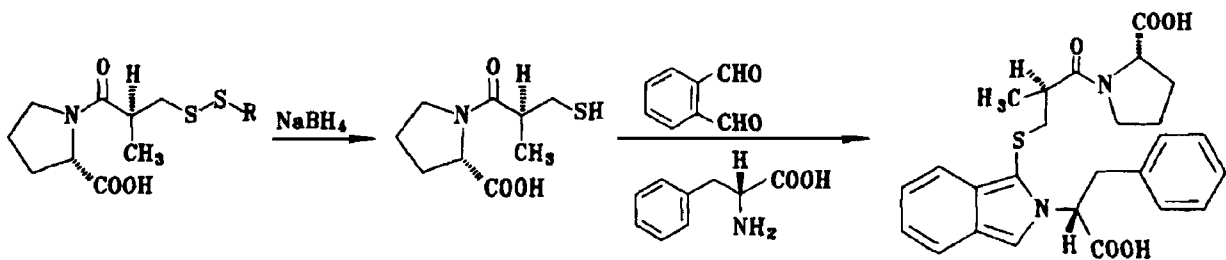
	Patient No.	Dose (mg)	Time (h)				
			0.0	0.5	1.0	2.0	4.0
Single dose	1	25.0		15.8	29.1	175.6	332.3
	2	25.0		86.3	185.6	591.6	620.0
Multiple dose	3	31.25(tid)	711.6		974.3		
	4	68.75(tid)	1374.1		1844.6		

### 5 衍生化反应条件

根据实际经验及文献报道<sup>[6]</sup>,测定卡托普利原形血浆药物浓度时,采血后必须立即分离出血浆并加入衍生化试剂,与巯基反应,以防止巯基的氧化。要求从采血到加入衍生化试剂的间隔不超过 10 min,否则卡托普利原形的含量将损失 5% 以上,并且随时间的拖延,含量将迅速降低,使实际操作难度较大,采用本文方法可避免这种困难。临床患者用药剂量变化范围较大(6.25~68.75 mg),本文方法灵敏度高,在不同剂量下均可满足测试要求,必要时应将血浆样品稀释后测定。

本文采用  $\text{NaBH}_4$  对血浆中卡托普利二聚物进行还原,并与相同浓度下卡托普利原形衍生化实验结果相比较,考察了不同的反应时间及温度对产率的影响,发现在 55℃, 30 min 后

反应达到完全。本文选择该条件进行还原反应。OPA 与脂肪族伯胺及巯基化合物反应生成具有荧光的化合物,该反应通常用于氨基酸的定性及定量分析<sup>[10]</sup>。本文则以 OPA 及 *D*-苯丙氨酸为衍生化试剂,与巯基化合物卡托普利进行定量反应,测定卡托普利的含量。反应式见图 2。该反应使卡托普利经衍生化后产生荧光,显著提高了检测灵敏度。反应迅速、线性关系良好,为卡托普利提供了灵敏的测试手段。该方法也有可能应用于其他含巯基化合物的测定。同时,由于反应中所采用的氨基酸是单一对映体,因而该反应具有立体选择性,可用于巯基化合物的立体选择性研究<sup>[11]</sup>。在本文方法中,如果用 *L*-苯丙氨酸代替 *D*-苯丙氨酸进行衍生化反应,产物在相同的色谱条件下保留时间提前约 2 min。



**Fig 2 Reaction scheme of the precolumn derivatization for the HPLC assay of total captopril.**

本文考察了使用不同的氨基酸(色氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸)作为衍生化试剂时,对衍生化反应及色谱行为的影响,发现使用 *D*-苯丙氨酸

得到的衍生化产物稳定性好,干扰少,峰形基本对称。衍生化反应时间与产物的峰高之间的关系见图 3。反应 10 min 即已趋于平衡,本文选

择反应 20 min。

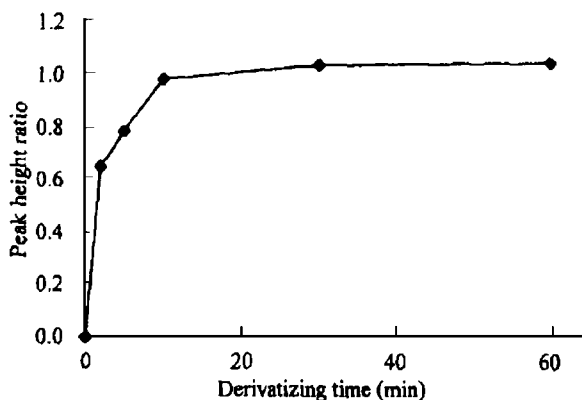


Fig 3 Peak intensity of the captopril derivative at various reaction times.

由于卡托普利易氧化,尤其在碱性条件下更易形成二硫化物,因而用硼酸缓冲液提取后,应尽快加入衍生化试剂进行反应。实验表明衍生化产物在反应液(pH 9.2 硼酸缓冲液)中较稳定,因而反应完全后,样品应在反应液中保存。本文将衍生化反应后的样品置于冰箱(4℃)保存直至进样,该条件下至少 3 d 样品浓度无显著变化。

## 讨 论

应用本法对临床样品的测试表明,该法灵敏度高,能够满足对不同用药剂量和不同身体状况患者临床血药浓度监测的需要。文献报道卡托普利代谢物的血浆浓度达峰时间约为 1.5 h,表 3 测试结果初步说明,在肾功能衰竭患者体内卡托普利代谢物达峰时间延长,易于蓄积。进一步的研究工作尚在进行。

## 参 考 文 献

- 1 Duchin KL, McKinsty DN, Cohen AI, *et al.* Pharmacokinetics of captopril in healthy subjects and in patients with cardiovascular diseases. *Clin Pharmacokinet*, 1988, **14**:241
- 2 Bathala MS, Weinstein SH, Meeker Jr FS, *et al.* Quantitative determination of captopril in blood and captopril and its disulfide metabolites in plasma by gas-chromatography. *J Pharm Sci*, 1984, **73**:340
- 3 Funke PT, Ivashkiv E, Malley MF, *et al.* Gas chromatography/selected-ion monitoring mass spectrometric determination of captopril in human blood. *Anal Chem*, 1980, **52**:1086
- 4 Kinoshita H, Nakamaru R, Tanaka S, *et al.* Enzyme immunoassay for captopril. *J Pharm Sci*, 1986, **75**:711
- 5 Klein J, Colin P, Scherer E, *et al.* Simple measurement of captopril in plasma by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection. *Ther Drug Monit*, 1990, **12**:105
- 6 Colin P, Scherer E. Simple high performance liquid chromatography determination of captopril in human plasma and cerebrospinal fluid. *J Liq Chromatogr*, 1989, **12**:629
- 7 Pereira CM, Tam YK, Collins-Nakai RL, *et al.* The pharmacokinetics of captopril in infants with congestive heart failure. *Ther Drug Monit*, 1991, **13**:209
- 8 Pereira CM, Tam YK. Simplified determination of captopril in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1988, **425**:208
- 9 Natarajan S, Ondetti MA, Lan SJ, *et al.* Oxidative disulfide coupling reaction of captopril. *US Patent*, 4,284,624, 1981-8-18
- 10 Sternson LA, Stobaugh JF, Repta AJ. Rational design and evaluation of improved *o*-phthalaldehyde-like fluorogenic reagents. *Anal Biochem*, 1985, **144**:233
- 11 Niebch G, Buechele B, Blome J, *et al.* Enantioselective high-performance liquid chromatography assay of (+)R- and (-)S- $\alpha$ -lipoic acid in human plasma. *Chirality*, 1997, **9**:32

## DETERMINATION OF CAPTOPRIL PLUS ITS DISULFIDE METABOLITES IN HUMAN PLASMA

Zhong Dafang(Zhong DF), Li Xueqing(Li XQ), Wang Aimin(Wang AM) and Chen Xiaoyan(Chen XY)

*(Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Shenyang  
Pharmaceutical University, Shenyang 110015)*

**ABSTRACT** A new and sensitive HPLC method has been developed for the determination of captopril plus its disulfide metabolites (total captopril) in human plasma. Captopril disulfides and the drug covalently bound to protein were reduced with sodium borohydride to captopril. After liquid-liquid extraction, captopril was treated with *o*-phthalaldehyde in the presence of *D*-phenylalanine. The fluorescent derivative of captopril was measured by HPLC using a C-18 reversed phase column with fluorescence detection at the excitation and emission wavelengths of 235 nm and 440 nm, respectively. The mobile phase consisted of a methanol-acetonitrile-phosphate buffer (0.02 mol•L<sup>-1</sup>, pH 6.4) mixture (30:30:135, *v/v*), and was set at a flow rate of 1 ml•min<sup>-1</sup>. The linear range of the assay was between 5 ng•ml<sup>-1</sup> (lower limit of quantitation) and 300 ng•ml<sup>-1</sup> for total captopril in plasma. The method was successfully applied to determine plasma concentrations of captopril plus its disulfide metabolites in hypertensive patients and was demonstrated to be suitable for the therapeutic drug monitoring.

**KEY WORDS** Captopril; HPLC; *o*-Phthalaldehyde