

1 – ФГБОУ ВО
«Первый Московский
государственный
медицинский университет
им. И.М. Сеченова», 119991,
Россия, г. Москва,
ул. Трубецкая, 8, стр. 2

2 – ФГБУ «Государственный
научный центр
«Институт иммунологии»
Федерального
медико-биологического
агентства России,
115478, Россия, г. Москва,
Каширское шоссе, 24

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

2 – National Research Center
Institute of Immunology
Federal Medical Biological
Agency of Russia, 24,
Kashirskoe road, Moscow,
115478, Russia

* адресат для переписки:
E-mail:
egorenkov.eugene@gmail.com

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ СОВМЕСТНОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТРАТОВ-МАРКЁРОВ ОСНОВНЫХ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЦИТОХРОМА P450 И ИХ МЕТАБОЛИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЭЖХ-МС/МС

Е.А. Егоренков^{1,2*}, В.В. Смирнов^{1,2}

Резюме. Разработана методика совместного количественного определения субстратов – маркёров основных изоферментов цитохрома P450 и их метаболитов в моче методом ВЭЖХ-МС/МС с целью определения активности следующих изоферментов: кофеин/параксантин для CYP1A2, лозартан/E-3174 для CYP2C9, кортизол/6-β-гидрокортизол для CYP3A4 и пинолин/6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин для CYP2D6. Карбамазепин использовался как внутренний стандарт. В качестве биообъекта использовалась моча, пробоподготовка образцов проводилась путем экстракции смесью этилацетат : гексан : диэтиловый эфир (50:35:15) с последующей корректировкой pH образца мочи боратным буфером (pH=9,4) и экстракцией смесью этилацетат : гексан (50:50). Методика успешно прошла процедуру валидации и может быть использована для определения активности изоферментов цитохрома P450 в клинической практике.

Ключевые слова: цитохром P450, CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6, коктейльный метод, фенотипирование, кофеин, лозартан, кортизол, пинолин.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SIMULTANEOUS ASSAY OF SUBSTRATES-MARKERS OF MAIN CYTOCHROME P450 ISOFORMS AND THEIR METABOLITES USING HPLC-MS/MS

E.A. Egorenkov^{1,2*}, V.V. Smirnov^{1,2}

Abstract. Simultaneous quantification method of assaying main CYP isoforms substrates-markers and their metabolites in urine using HPLC-MS/MS was developed to determine activity of following isoforms: caffeine/paraxanthine for CYP1A2, losartane/E-3174 for CYP2C9, cortisol/6-β-hydroxycortisol for CYP3A4 and pinoline/6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline for CYP2D6. Carbamazepine was used as internal standart. Urine was used as biological object, samples were prepared by extraction with ethyl acetate : hexane : diethyl ether (50:35:15) mixture continued with pH correction of urine sample using borate buffer (pH=9,4) and following extraction with ethyl acetate : hexane mixture (50:50). Method was successfully validated and can be put in clinical practice for CYP isoforms activity determination.

Keywords: Cytochrome P450, CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6, «cocktail» method, phenotyping, caffeine, losartane, cortisol, pinoline.

ВВЕДЕНИЕ

Практически любая фармакотерапия (в особенности полиграмазия) сопровождается риском возникновения нежелательных лекарственных явлений. В основе механизмов развития нежелательных лекарственных реакций лежит множество факторов, одним из которых является измененная активность ферментов метаболизма, в частности системы цитохрома P450, отвечающей за 75% от общего числа метаболических превращений в организме [1]. Система цитохрома P450 (в литературе обозначаемая CYP) включает в себя множество изоферментов, каждый из которых выполняет свою отдельную функцию в процессах биотрансформации

и имеет специфический субстрат [2]. Для определения активности CYP широко применяется метод фенотипирования, основанный на определении активности метаболита по отношению концентраций вещества-субстрата конкретного изофермента и его метаболита в биожидкостях организма [3]. Существует множество методик определения активности отдельных изоферментов CYP, однако, узнав о состоянии активности только одного изофермента, невозможно получить полные сведения об активности системы метаболизма в целом. Поэтому в последнее время набирают популярность «коктейльные» методы фенотипирования, позволяющие определить активность нескольких изоферментов CYP в одной пробе [4]. После

изучения описанных в литературе «коктейльных» методов фенотипирования CYP [5] авторами были учтены основные недостатки представленных методов (использование потенциально опасных лекарственных веществ в качестве маркёров; использование венозной крови в качестве биообъекта, что повышает инвазивность метода; игнорирование возможности использования эндогенных субстратов), в результате чего был предложен новый состав «коктейля» для определения активности метаболизма, а также разработана методика совместного количественного определения субстратов-маркёров и их метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве субстратов-маркёров для определения активности изоферментов CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 и CYP2D6 использовались следующие вещества (приведены в паре с метаболитами): кофеин/параксантин, лозартан/Е-3174, кортизол/6-β-гидроксикортизол и пинолин/6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин соответственно. Кортизол, 6-β-гидроксикортизол, пинолин и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин являются эндогенными веществами и всегда присутствуют в биожидкостях организма. Карбамазепин использовался в качестве внутреннего стандарта. Биологическая матрица – интактная моча, очищенная от эндогенных аналитов путём проведения двухкратной экстракции согласно разработанной методике пробоподготовки. Пробоподготовка проводилась методом жидкостной экстракции. Калибровочные образцы готовились с использованием интактной плазмы в соответствии с таблицей 1.

К 1 мл образца мочи, помещенному в стеклянную пробирку для экстракции объемом 4 мл, при-

бавляли стандартный раствор ВС (до концентрации 10 нг/мл), встряхивали смесь на вихреобразной мешалке типа «вортекс» в течение 5 секунд, после чего в пробирку прибавляли 2 мл смеси этилацетат : гексан : диэтиловый эфир (50:35:15), после чего пробирку помещали в вихревую мешалку и экстрагировали в течение 10 минут. После процедуры экстракции органический слой отделяли и помещали в чистую пробирку для экстракции объемом 4 мл. К оставшейся водной фазе добавляли 0,5 мл боратного буфера (pH=9,4), 2 мл смеси этилацетат : гексан (50:50), после чего проводили процедуру экстракции на вихревой мешалке в течение 10 минут. После экстракции органический слой отделяли и объединяли с органическим слоем, полученным после первого этапа экстракции. Объединенный органический слой упаривали в вакуумно-ротаторном испарителе, после чего сухой остаток перерастворяли в 100 мкл метанола, затем полученный раствор переливали в виалу для хроматографирования и помещали в автосемплер хроматографа.

Хроматографический анализ проводился на системе ВЭЖХ-МС/МС, состоящей из жидкостного хроматографа Agilent 1260 (Agilent Technologies, США), оснащенного tandemным масс-спектрометрическим детектором Agilent 6400 QQQ (Agilent Technologies, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате были подобраны хроматографические условия, представленные в таблице 2.

Количественное определение проводилось методом внутреннего стандарта. Для построения калибровочных графиков использовались калибро-

Таблица 1.

Концентрация аналитов в калибровочных образцах

№ пробы	Концентрация аналита, нг/мл								
	Кофеин	Параксантин	Лозартан	EXP-3174	Кортизол	6-β-ОН-кортизол	Пинолин	Метаболит пинолина	Карбамазепин (BC)
1	10	10	10	10	10	10	0,5	0,5	10
2	25	25	25	25	25	25	0,75	0,75	10
3	50	50	50	50	50	50	1	1	10
4	100	100	100	100	100	100	1,5	1,5	10
5	250	250	250	250	250	250	2	2	10
6	500	500	500	500	500	500	2,5	2,5	10
7	1000	1000	1000	1000	1000	1000	5	5	10
8	2500	2500	2500	2500	2500	2500	7,5	7,5	10
9	5000	5000	5000	5000	5000	5000	10	10	10

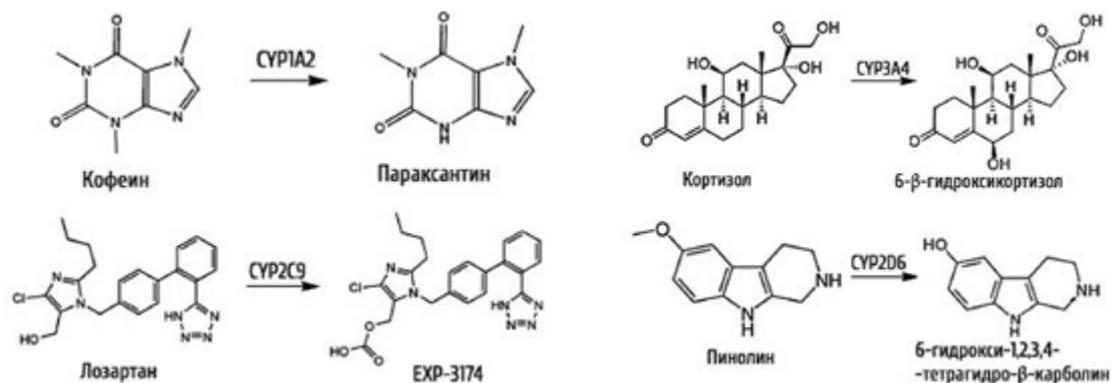


Рисунок 1. Химические формулы анализируемых субстратов-маркёров и их метаболитов (приведены в виде реакций с участвующими в них изоферментами)

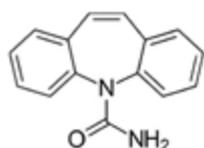


Рисунок 2. Химическая формула внутреннего стандарта карбамазепина

вочные образцы, приготовленные в соответствии с таблицей 1. После хроматографирования калибровочных образцов по полученным данным строились калибровочные графики зависимости отношения площади пика аналита к площади пика ВС от концентрации аналита.

Таблица 2.

Хроматографические параметры и параметры детектирования разработанной методики

Хроматограф	Agilent 1290 Infinity		
Колонка	Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1×50 мм, 1,8 мкм		
Температура колонки	50 °С		
Подвижная фаза	Компонент А: раствор 5 мМ аммония формиата в 0,01% растворе муравьиной кислоты в воде Компонент В: 0,01 % муравьиной кислоты в ацетонитриле		
Скорость потока подвижной фазы	0,4 мл/мин		
Элюирование	Градиентное		
	Время, мин	Компонент А, % (V/V)	Компонент В, % (V/V)
	0	90	10
	1,5	90	10
	2	80	40
	8,5	30	70
	12	95	5
14	90	10	
Объем вводимой пробы	10 мкл		



Жидкостной хроматограф Agilent Technologies 1290



Масс-спектрометрический детектор Agilent Technologies 6400 QQQ

Ориентировочные времена удерживания, мин	кофеин – около 4,1; параксантин – около 3,0; лозартан – около 7,0; ЕХР-3174 – около 6,2; кортизол – около 4,9; 6-β-гидрокортизол – около 4,3; 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин – около 1,1; пинолин – около 5,0; карбамазепин – около 7,2				
Время анализа	14 мин				
Параметры масс-детектирования	Ионизация: ESI Напряжение на капилляре: 3500 В Температура ионной трубки: 350 °С Температура ионизационной камеры: 400 °С Вспомогательный газ: 10 л/мин Газ периферийного слоя: 11 л/мин Сметающий газ: 3 л/мин Давление газа в ячейке соударений: 2,0 мТорр Параметры MRM переходов:				
	Аналит	Полярность	Ион-прекурсор (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Энергия соударения, В
	Кофеин	+	195,0	138,3	30
	Параксантин	+	181,0	124,4	30
	Лозартан	+	423,2	207,1	34
	ЕХР-3174	+	437,2	235,1	34
	Кортизол	-	407,0	331,0	-26
	6-β-гидрокортизол	-	423,0	347,0	-26
	Пинолин	+	203,2	147,0	35
	6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин	+	189,0	117,0	30
Карбамазепин (BC)	+	237,1	194,0	30	

Была проведена валидация методики в соответствии с требованиями «Руководства по экспертизе лекарственных средств» под редакцией проф. А.Н. Мирнова, том I, по следующим показателям: селективность, линейность, точность и прецизионность, эффект матрицы, степень извлечения, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Селективность. Для определения селективности были протестированы 6 образцов биологической матрицы (моча, очищенная от эндогенных исследуемых веществ) на возможность создания помех потенциально мешающими веществами (эндогенные компо-

ненты матрицы, метаболиты, продукты разложения). Отсутствие потенциально мешающих веществ принимается, если площади пиков не превышают 20% от значения площади пика стандарта НКПО (нижнего предела количественного определения) определяемых веществ.

Линейность. Линейность зависимости отношения площадей пика исследуемых веществ к площади пика ВС от концентрации исследуемых веществ определялась по 9 ненулевым калибровочным стандартам.

Коэффициент корреляции построенных калибровочных кривых составил более 0,99, что удовлетворяет критериям приемлемости. После построения калибровочной кривой был проведен обратный расчет концентраций используемых стандартов по всем кривым и определены статистические данные. Отклонения нижнего предела количественного определения (НПКО) от теоретической концентрации составили не более 20%, Отклонения всех стандартов, кроме НПКО, от теоретической концентрации – не более 15%, что удовлетворяет критериям приемлемости.

Таблица 3.

Полученные уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции

Аналит	Диапазон линейности, нг/мл	Уравнение калибровочной кривой	Коэффициент корреляции
Кофеин	10–5000	$y=0,0019x-0,0061$	0,99612
Параксантин	10–5000	$y=0,0017x+0,0004$	0,99964
Лозартан	10–5000	$y=0,0004x+0,0418$	0,99596
Е-3174	10–5000	$y=0,0012x+0,1023$	0,99712
Кортизол	10–5000	$y=0,00004x+0,009$	0,99637
6-β-гидрокортизол	10–5000	$y=0,0003x+0,0085$	0,99539
Пинолин	0,5–10	$y=0,0003x+0,00005$	0,99606
6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин	0,5–10	$y=0,0003x+0,00005$	0,99280

Точность и прецизионность

Точность и прецизионность метода внутри одной серии оценивались по результатам параллельных анализов образцов контроля качества. Каждый образец определялся в 5 повторах. Точность и прецизионность оценивалась как внутри, так и между сериями.

Среднее значение концентрации образца контроля качества не превышало 15% от теоретической величины (для НПКО – 20%), что говорит об удовлетворительной точности методики. Относительное стан-

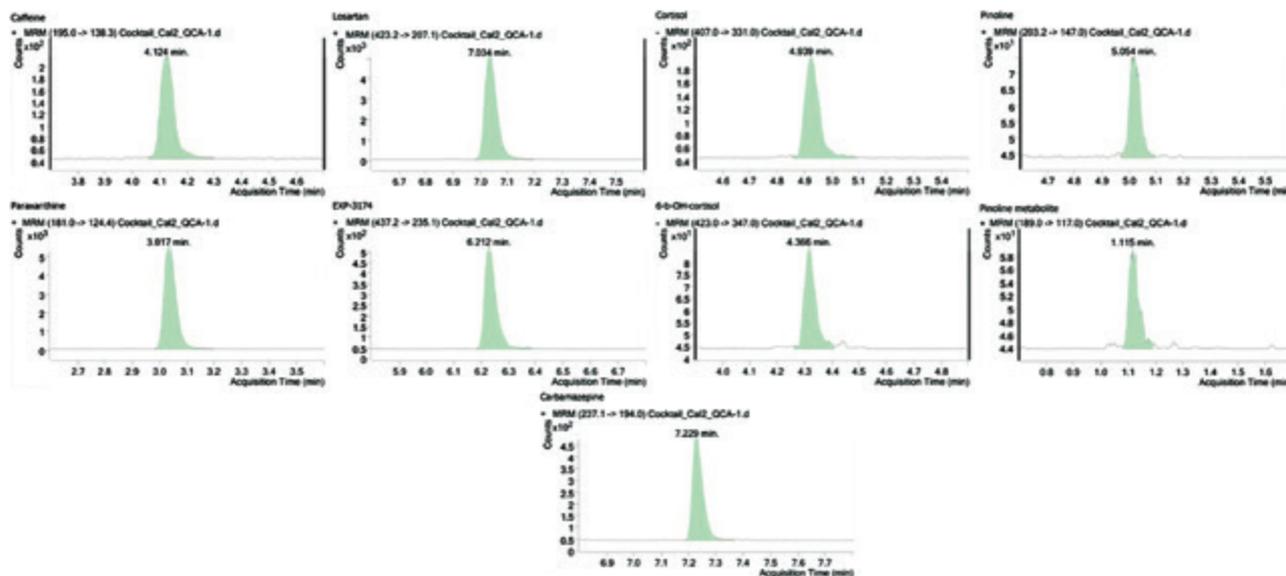


Рисунок 3. Хроматограмма калибровочного образца № 2

дартное отклонение значений концентраций каждого образца контроля качества не превышало 15% (для НПКО – 20%), что говорит об удовлетворительной прецизионности методики.

Методика удовлетворяла прочим критериям приемлимости валидационных параметров согласно «Руководства по экспертизе лекарственных средств» под редакцией проф. А.Н. Миронова, том I, а так же руководством FDA для предприятий «Bioanalytical Method Validation» (Май 2011г.), рекомендациями EMEA «Guideline on validation of bioanalytical method» (Ноябрь 2009 г.), а именно: эффект матрицы (коэффициент вариации воспроизводим и составил не более 15% для образцов контроля качества), степень извлечения (значение коэффициента вариации составило не более 15% для образцов контроля качества), предел количественного определения (предел количественного определения для кофеина, параксантина, лозартана, E-3174, кортизола и 6-β-гидроксикортизола составил 10 нг/мл, для пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина – 0,5 нг/мл, т.к. для этих концентраций возможно определение аналитов со отклонением среднего значения и значением относительного стандартного отклонения не более 20% в диапазоне линейной зависимости), перенос пробы (отклик пика при последовательном вводе образца контроля качества с высокой концентрацией анализируемых веществ составил не более 20% от НПКО), стабильность при различных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана селективная, точная, чувствительная и воспроизводимая методика совместного количественного определения субстратов – маркёров основных изоферментов цитохрома P450 и их метаболитов в моче с помощью ВЭЖХ-МС/МС при

использовании жидкостной экстракции в качестве пробоподготовки. Была проведена валидация аналитической методики по основным параметрам: селективности, линейности, точности и прецизионности, эффекту матрицы, степени извлечения, пределу количественного определения, переносу пробы, стабильности. Разработанная методика удовлетворяла критериям приемлимости по всем валидационным параметрам.

Разработанная методика может быть использована для определения метаболической активности основных изоферментов цитохрома P450 в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. F.P. Guengerich. Cytochrome p450 and chemical toxicology // Chemical Research in Toxicology. 2008. V. 21(1). P. 70–83.
2. В.Г. Кулес. Метаболизм лекарственных средств: клинко-фармакологические аспекты. – М.: Реафарм, 2004. 144 с.
3. P.M. De Kesel et al. Alternative Sampling Strategies for Cytochrome P450 Phenotyping // Clinical Pharmacokinetics. 2016. V. 55(2). P. 169–84.
4. S. Ghassabian et al. Simultaneous in vivo phenotyping of CYP enzymes // Methods in Molecular Biology. 2013. V. 987. P. 261–267.
5. Е.А. Егоренков, В.В. Смирнов. «Коктейльные» методы определения метаболической активности изоферментов цитохрома р-450 *in vivo* с помощью биоаналитических методик: обзор существующих методик и перспектива их использования в клинической практике. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1(14). С. 184–188.