

1 – Первый МГМУ 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, корп. 2

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, 24/2, Kashirskoe road, Moscow, 115478, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: rustixxx13@gmail.com

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИНОЛИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТА 6-ГИДРОКСИ-1,2,3,4-ТЕТРАГИДРО-БЕТА-КАРБОЛИНА С ЦЕЛЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТА CYP2D6

Р.Х. Абдрашитов^{1*}, А.Е. Петухов^{1,2}, В.В. Смирнов^{1,2}

Резюме. Разработана чувствительная методика количественного определения пинолина и его метаболита в плазме крови человека после пробоподготовки ТФЭ с помощью метода высокоеффективной жидкостной хроматографии с трехквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием. Аналитический диапазон методики составляет от 250 пг/мл до 1500 пг/мл и для пинолина, и для его метаболита 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина. Разработанную методику возможно в дальнейшем использовать для определения текущего статуса активности CYP2D6.

Ключевые слова: CYP2D6, LC-MS/MS, пинолин, 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF BIOANALYTICAL METHOD FOR QUANTIFICATION OF PINOLINE AND ITS METABOLITE 6-OH-1,2,3,4-TETRAHYDROCARBOLINE FOR THE PURPOSE OF CYPD6 ACTIVITY DETERMINATION

R.K. Abdrashitov^{1*}, A.E. Petukhov^{1,2}, V.V. Smirnov^{1,2}

Abstract. A sensitive method for quantification of pinoline and its metabolite in human plasma using solid phase extraction and high performance liquid chromatography with mass-spectrometry was developed. Analytical range was 250–1500 pg/ml both for pinoline and for 6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline. The developed method may be used to determine the current status of CYP2D6 activity.

Keywords: CYP2D6, LC-MS/MS, pinoline, 6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline.

ВВЕДЕНИЕ

Изофермент CYP2D6 отвечает за метаболизм 20–30% лекарственных препаратов. К этим препаратам относятся трициклические антидепрессанты, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, антагонисты 5HT3-рецепторов, антидепрессанты, опиаты, амфетамины, а также антагонисты β-адренорецепторов и антиаритмические средства [1]. Данные лекарственные препараты оказывают выраженное фармакологическое действие, при этом при их применении часто возникают межлекарственные взаимодействия, такие как ингибирование метаболизма нортриптилина и дезипримина параксантином, венлафаксина дифенгидрамином, метопролола гидроксихлорохином и индукция метаболизма кодеина рифампицином. Так же возникают такие нежелательные ле-

карственные реакции (НЛР), как периферическая нейропатия, лактатацидоз.

Среди десятков изоферментов цитохрома P-450, которые участвуют в биотрансформации ксенобиотиков, изофермент CYP2D6 является одним из наиболее важных ферментов, осуществляющих метаболизм лекарственных средств. Изофермент в основном экспрессируется в печени, но он также локализуется в легких и сердце. Особенностью данного изофермента является его высокая межвидовая и внутривидовая вариабельность активности, причиной которой является генетический полиморфизм. Такой полиморфизм может приводить к 30–40-кратной разнице в клиренсе препаратов, что приводит к выходу концентрации из терапевтического окна как по нижней, так и по верхней границе [2]. Как следствие, такие различия в

активности CYP2D6 могут привести не только к серьезным НЛР (например, при антидепрессантной терапии), но также может наблюдаться отсутствие фармакологического эффекта (например, отсутствие анальгетического эффекта опиоидных препаратов).

Определение активности изофермента CYP2D6 позволяет оценить текущий статус метаболизма пациента. Такая оценка позволяет скорректировать терапию для улучшения фармакологического эффекта и снизить частоту возникновения НЛР.

Субстратная специфичность определенных ферментов метаболизма лекарственного средства (ЛС) позволила разработать методы их фенотипирования. Активность того или иного фермента метаболизма определяется по фармакокинетике его специфического субстрата, называемого «маркерным» субстратом, путем измерения его концентрации и концентрации его метаболита в плазме крови или в моче [3]. На основании этих данных рассчитывается так называемый метаболический индекс, равный отношению концентрации ЛС к концентрации его метаболита.

В зависимости от субстрата методы определения активности изоферментов можно разделить на две группы: инвазивные и неинвазивные. В настоящее время существует несколько инвазивных методов определения активности изофермента CYP2D6 с использованием нескольких маркерных субстратов: дебризохина, метопролола, декстрометорфана, спартеина и трамадола [4].

В инвазивных методах определения активности CYP2D6 маркерный субстрат вводится перорально или внутривенно и затем через определенное время в сыворотке или моче определяют концентрацию маркерного субстрата и его метаболита. Такие методы имеют ряд недостатков, связанных с необходимостью приема ЛС, которые являются субстратами и могут привести к развитию НЛР (например, аллергическим).

Методики по определению эндогенных веществ и их метаболитов являются более перспективными, так как позволяют оценить активность изоферментов без введения пациенту специфических «маркеров». Даные методики являются практически безопасными.

Проводится много исследований по поиску эндогенных веществ, которые метаболизируются только одним изоферментом. Широкое исследование провел A. Yu с коллегами по поиску эндогенных веществ, специфичных изоферменту CYP2D6 [5]. В своем исследовании ученые рассмотрели ряд эндогенных веществ, потенциально являющихся специфическими субстратами для CYP2D6. Было установлено, что изофермент CYP2D6 незначительно метаболизирует эндогенные фенилэтиламины (2-фенилэтиламин, октопамин, си-

нефрин, метанефрин и норметанефрин), индолэтиламины (триптамин, серотонин, 6-метокситриптамин и мелатонин) и β -карболины (гарман, норгарман и триптолин). Однако индолметиламин [5-метокси-N,N-диметилтриптамин (5-MDMT)] и пинолин (6-метокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин) показали относительно высокое сходство к CYP2D6 и О-деметилировались только под действием CYP2D6. При добавлении к исходным веществам моноклональных антител против CYP2D6 О-деметилирование 5-MDMT и пинолина не наблюдалось. Специфичность пинолина по отношению к CYP2D6 около 99% относительно других изоферментов цитохрома Р-450.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа отбирали кровь у пациентов обоих полов. Перед экстракцией кровь центрифугировали и для дальнейшего анализа отбирали плазму. Образцы чистой и исследуемой плазмы хранили в морозильнике для плазмы при температуре от -75°C до -80°C . Стандартные растворы хранили в холодильнике при температуре $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$.

Пробоподготовку проводили методом твердофазной экстракции (ТФЭ) на сериях плазмы с добавлением пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина до достижения концентраций 250, 375, 500, 750, 1000, 1250 и 1500 пг/мл и внутреннего стандарта галантамина с концентрацией 20 нг/мл. Перед внесением пробы в картридж Chromabond[®] C18 для ТФЭ проводили активацию сорбента. В картридж, подключенный к вакуумному насосу, вносили 2 мл метанола, затем 1 мл воды и 2 мл боратного буфера pH 9,6.

В активированный картридж вносили 500 мкл плазмы, затем последовательно добавляли 1 мл воды, 1 мл смеси ацетонитрил – вода (10:90), элюирование проводили 0,5 мл 0,1% раствором триэтиламина в метаноле. Полученный элюат упаривали до сухого остатка и растворяли в 100 мкл 1% муравьиной кислоты в воде.

В качестве метода определения был выбран метод обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием на МС-детекторе с системой трех квадруполей.

Исследуемые вещества – пинолин (рисунок 1) и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин (рисунок 2) – и внутренний стандарт галантамин (рисунок 3) являются полярными, ароматическими и проявляют основные свойства. Для хроматографирования полученных проб использовали предколонку Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 12,5x2,1 мм, 5 мкм и колонку Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 100x2,1 мм, 1,8 мкм.

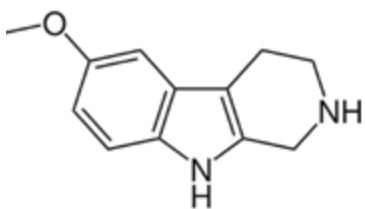


Рисунок 1. Пинолин

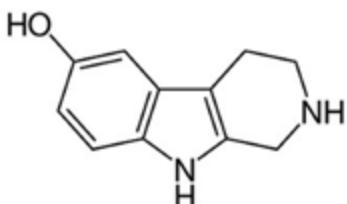


Рисунок 2. 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин

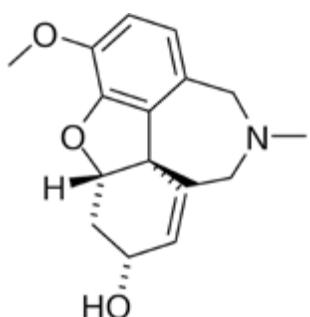


Рисунок 3. Галантамин

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Были подобраны следующие хроматографические условия:

Предколонка: Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 12,5x 2,1 мм, 5 мкм.

Колонка: Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 100x 2,1 мм, 1,8 мкм.

Температура колонки: (50±1) °C.

Детектирование: МС/МС, MRM-переходы для пинолина 203,2 m/z → 174,0 m/z, для 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина 189,2 m/z → 160,0 m/z, для галантамина 288,3 m/z → 213,0 m/z.

Метод ионизации: электроспрей (ESI) в положительной полярности.

Объем пробы: 5 мкл.

Время удерживания:

- 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин – 1,1 мин;
- пинолин – 5,0 мин;
- галантамин – 2,4 мин.

Время хроматографирования: 14 мин.

Скорость потока: 0,4 мл/мин.

Подвижная фаза:

Элюент А: 5 мМ аммония формиата и 0,01% муравьиной кислоты в воде.

Элюент В: 0,01% муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Методика

Стабилизируют систему ВЭЖХ в условиях начального градиента (элюент А : элюент В = 95:5) в течение 15 мин.

Градиентная программа

Время, мин	Элюент А, % (об/об)	Элюент В, % (об/об)
0	95	5
1,5	95	5
2	70	30
8,5	40	60
12	95	5
14	95	5

В качестве метода количественного определения был выбран метод калибровки с внутренним стандартом. Для построения калибровочного графика были приготовлены растворы в плазме с добавлением известного количества стандартных образцов пинолина, его метаболита и внутреннего стандарта галантамина. Сначала готовили стандартные растворы пинолина, его метаболита и галантамина в метаноле. Затем путем разведения этих растворов в плазме получали серию калибровочных растворов. Концентрации калибровочных растворов были следующие: 250 пг/мл, 375 пг/мл, 500 пг/мл, 750 пг/мл, 1000 пг/мл, 1250 пг/мл и 1500 пг/мл. Концентрация внутреннего стандарта галантамина составила 20 нг/мл. После хроматографирования полученных растворов строили калибровочные графики зависимости отношения площадей исследуемого вещества к внутреннему стандарту (ось X) от известных концентраций (ось Y), по которым определяли концентрации пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина.

Методика была валидирована на основе «Руководства по экспертизе лекарственных средств» под редакцией проф. А.Н. Миронова., том I, а также руководств FDA [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] и EMA (Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. 2009) по показателям линейности, селективности, правильности, прецизионности и пределу количественного определения.

Диапазон линейности определения был доказан для обоих анализаторов в диапазоне концентраций от 250 пг/мл до 1500 пг/мл. Коэффициент корреляции составил $R=0,99474$ для пинолина и $R=0,99534$ для 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина. Уравнение калибровочной кривой для пинолина: $y=0,0026x + 0,0574$; для 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина: $y = 0,0048x + 0,0671$.

Селективность. На хроматограммах образцов интактной плазмы, очищенной от пинолина и его метаболита путем жидкостной экстракции, не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим пинолину, метаболиту пинолина и галантамина.

На хроматограмме плазмы, содержащей стандартные образцы пинолина, его метаболита и галантамина, пики не накладывались. Разрешение пиков составляло более 1,5 между каждым пиком.

Правильность и прецизионность. Правильность и прецизионность определяли в течение 1 рабочего дня (внутри серии) и в течение нескольких дней (между сериями) на 4 уровнях концентраций: 250 пг/мл, 375 пг/мл, 750 пг/мл и 1500 пг/мл. Расчет концентраций определяемых веществ в образцах контроля качества выполняли по уравнению калибровочного графика, полученного в составе текущей аналитической серии. Значения относительного стандартного отклонения и относительной погрешности для значений концентраций для нижней точки не превышала 20%, а для остальных – 15%.

Предел количественного определения. Предел количественного определения для пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина составил 250 пг/мл. Критерием предела количественного определения служило соотношение «сигнал : уровень флюктуационных шумов нулевой линии» не менее 4:1.

Пригодность хроматографической системы. Разрешение пиков пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина было не менее 1,5; это го-

ворит о полном их разделении. Фактор асимметрии пинолина – 1,37, а 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина – 1,24. Значение эффективности для испытуемых веществ и внутреннего стандарта составила 25123, что говорит о высокой эффективности хроматографической системы (требуется значение не менее 3000).

Таблица 1.

Правильность и прецизионность методики количественного определения пинолина

Введено (пг/мл)	Относительное стандартное отклонение, % (n=5)		Относительная погрешность, % (n=5)	
	Внутри серии	Междусериями	Внутри серии	Междусериями
250	8,95	9,01	11,24	12,48
375	7,13	7,47	7,65	8,12
750	4,67	4,81	5,12	5,87
1500	1,57	1,14	3,12	3,31

Таблица 2.

Правильность и прецизионность методики количественного определения 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина

Введено, пг/мл	Относительное стандартное отклонение, % (n=5)		Относительная погрешность, % (n=5)	
	Внутри серии	Междусериями	Внутри серии	Междусериями
250	6,84	7,35	9,12	11,64
375	5,78	6,01	8,05	9,18
750	4,12	4,41	5,61	6,12
1500	2,85	2,90	4,12	4,48

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана чувствительная методика количественного определения пинолина и его метаболита в плазме после пробоподготовки ТФЭ с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с

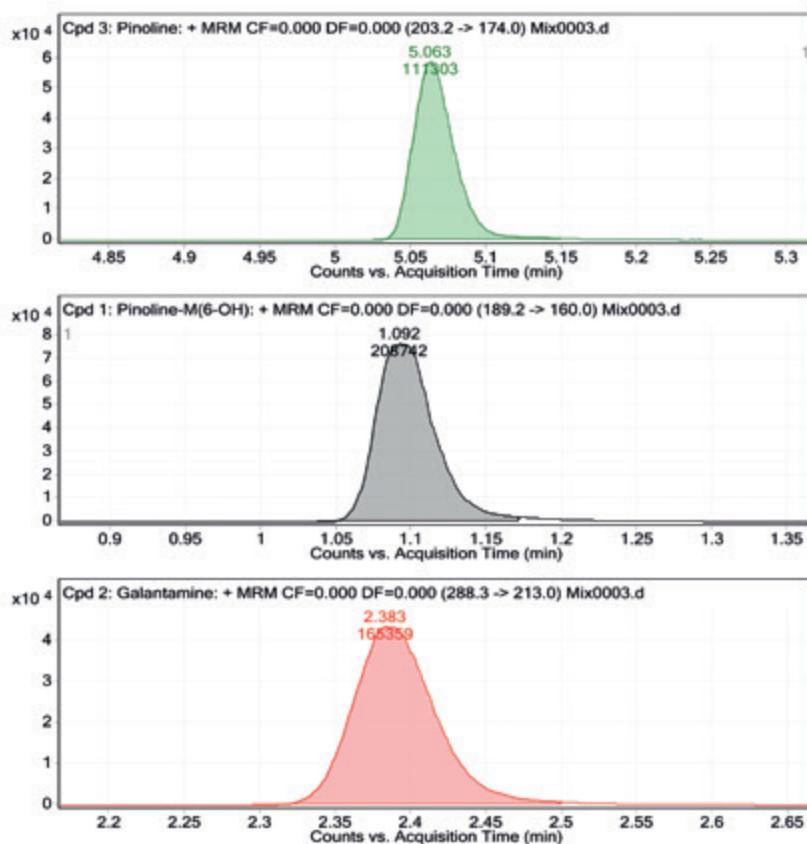


Рисунок 4. Хроматограмма раствора, содержащего пинолин (250 пг/мл), его метаболит (250 пг/мл) и раствор внутреннего стандарта (20 нг/мл)

трехквадрупольным масс-спектральным детектированием. Данный метод был валидирован по показателям линейности, селективности, правильности, прецизионности и пределу количественного определения. Аналитический диапазон методики составил 250–1500 пг/мл. Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

С помощью разработанной методики было проведено исследование по оценке активности изофермента CYP2D6, результаты которого приведены в статье [6]. По результатам измерений был сделан вывод о возможности дальнейшего использования методики для определения текущего статуса активности CYP2D6. Так как данная методика является неинвазивной, ее можно использовать у пациентов с непереносимостью экзогенных маркерных субстратов, а также у беременных, кормящих женщин и детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. H.P. Sheldon, et al. Cytochrome P450 2D6 Phenocconversion Is Common in Patients Being Treated for Depression: Implications for Personalized Medicine // Journal of Clinical Psychiatry. 2013. V.74(6). P. 614–621.
2. В.Г. Кукес, Д.А. Сычев, Е.В Ших. Изучение биотрансформации лекарственных средств – путь к повышению эффективности и безопасности фармакотерапии // Врач. 2007. № 1. С. 6–8.
3. В.Г. Кукес. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. – М.: Издательство «Реафарм», 2004. 144 с.
4. U.M. Zanger, S. Raimundo, M. Eichelbaum. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology. 2004. V. 369. P. 23–37.
5. A. Yu, et al. Screening for endogenous substrates reveals that CYP2D6 is a 5-methoxyindolethylamine O-demethylase // Pharmacogenetics. 2003. V. 13. P. 307–319.
6. Д.А. Сычев, М.С. Застрожин, В.В. Смирнов, Л.М. Савченко, Е.А. Брюн, Ю.Ш. Гущина, А.С. Сорокин, А.Д. Агузаров. Ассоциация активности изофермента CYP2D6 с профилем эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих патологическим влечением к алкоголю // Вестник РГМУ. 2015. № 4 С. 32–36.