

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-4-53-60>
УДК 615.9



Оригинальная статья/Research article

Химико-токсикологический анализ антиретровирусных препаратов

Т. Н. Комаров^{1*}, М. В. Белова^{2,3}, Д. Д. Столярова³, И. Е. Шохин¹, Д. С. Богданова¹,
О. А. Мискив¹, Ю. В. Медведев^{1,3}, И. М. Коренская⁴

1 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

2 – ГБУЗ «НИИ Скорой помощи им. Н. В. Склифосовского» Департамента здравоохранения города Москвы, 129090, г. Москва, Большая Сухаревская пл., д. 3

3 – ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

4 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., 1

*Контактное лицо: Комаров Тимофей Николаевич. E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

Статья получена: 18.10.2019. Статья принята к печати: 22.11.2019

Резюме

Введение. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) продолжает оставаться главной социально значимой инфекцией во всем мире. ВИЧ-инфицированным пациентам оказывается медицинская помощь, в том числе фармакотерапия антиретровирусными препаратами (АРВ). Как и все лекарственные препараты, АРВ имеют ряд побочных действий, которые стоит принимать во внимание при их назначении в составе высокоактивной антиретровирусной терапии. Нередки случаи, когда побочные действия АРВ становились причиной поступления пациентов в отделения токсикологии. Поэтому разработка новых методик анализа АРВ в биологических жидкостях для своевременной диагностики острых отравлений данной группы веществ является актуальной на сегодняшний день.

Цель. Целью исследования является разработка методики скрининг-анализа атазанавира, абакавира, невирапина, ритонавира, лопинавира, зидовудина, дарунавир и эфавиренза в моче для идентификации данных веществ как возможных токсикантов при отравлениях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Материалы и методы. Идентификацию данной группы АРВ проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения метанолом.

Результаты и обсуждение. Подобраны оптимальные условия пробоподготовки, хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования для определения исследуемых АРВ. Данная методика была апробирована на образцах мочи пациентов отделения острых отравлений и соматопсихиатрических расстройств (ООСПР) с острыми отравлениями АРВ.

Заключение. Разработана методика идентификации атазанавира, абакавира, невирапина, ритонавира, лопинавира, зидовудина, дарунавир и эфавиренза в моче человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработанная методика может быть использована для идентификации данных веществ как возможных токсикантов при отравлениях. Перспектива развития темы: расширение группы анализируемых веществ, разработка методики количественного определения исследуемых АРВ в биологических жидкостях.

Ключевые слова: атазанавир, абакавир, невирапин, ритонавир, лопинавир, зидовудин, дарунавир, эфавиренз, ВЭЖХ-МС/МС, химико-токсикологический анализ.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Т. Н. Комаров участвовал в разработке аналитической методики. Д. Д. Столярова, О. А. Мискив, Д. С. Богданова участвовали в подготовке литературного обзора, пробоподготовке и анализе образцов методом ВЭЖХ-МС/МС. М. В. Белова участвовала в разработке научного направления исследования и предоставила образцы для анализа. И. Е. Шохин, И. М. Коренская, Ю. В. Медведев и все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в формате научной дискуссии.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Белова М. В., Столярова Д. Д., Шохин И. Е., Богданова Д. С., Мискив О. А., Медведев Ю. В., Коренская И. М. Химико-токсикологический анализ антиретровирусных препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(4): 53–60.

Chemical and Toxicological Analysis of Antiretroviral Drugs

Timofey N. Komarov^{1*}, Maria V. Belova^{2,3}, Daria D. Stolyarova³, Igor E. Shohin¹,
Dana S. Bogdanova¹, Olga A. Miskiv¹, Yuri V. Medvedev^{1,3}, Irina M. Korenskaya⁴

1 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – N. V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Department, 3, Bol'shaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russia

3 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

4 – Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394018, Russia

*Corresponding author: Timofey N. Komarov. E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

Received: 18.10.2019. Accepted: 22.11.2019

Abstract

Introduction. Human Immunodeficiency Virus (HIV) is one of the main socially significant infection all over the world. HIV-positive patients take medical care, including antiretroviral drugs (ARVs) pharmacotherapy. Like all drugs, ARVs have lots of side effects that should be taken when prescribing drugs as part of highly active antiretroviral therapy. There are many cases when side effects of ARVs caused patients to enter the toxicology department. Therefore, the development of new methods for the analysis of ARV in biological fluids for the timely diagnosis of treatment of poisoning of this group of drugs is relevant today.

Aim. The aim of this study is development of screening analysis of atazanavir, abacavir, nevirapine, ritonavir, lopinavir, zidovudine, darunavir and efavirenz in the urine to identify these drugs as possible toxicants for poisoning by high-performance liquid chromatography with tandem mass-selective detection (HPLC-MS/MS).

Materials and methods. Identification of ARV was performed by HPLC-MS/MS. Methanol precipitation method was used as a sample preparation.

Results and discussion. The optimal conditions for sample preparation, chromatographic separation, and mass-spectrometric detection were selected to determine the studied ARVs. This method was tested on urine samples from patients in the Department of Acute Poisoning and Somatopsychiatric Disorders (ООСПД) with acute ARV poisoning.

© Комаров Т. Н., Белова М. В., Столярова Д. Д., Шохин И. Е., Богданова Д. С., Мискив О. А., Медведев Ю. В., Коренская И. М., 2019

© Komarov T. N., Belova M. V., Stolyarova D. D., Shohin I. E., Bogdanova D. S., Miskiv O. A., Medvedev Yu. V., Korenskaya I. M., 2019

Conclusion. This screening method for analyse atazanavir, abacavir, nevirapine, ritonavir, lopinavir, zidovudine, darunavir and efavirenz in human urine has been developed by HPLC-MS/MS. The developed method can be used to identify these drugs as possible toxicants in case of poisoning. The prospect for the development of the topic is the inclusion of new molecules in the method and quantitative determination of the studied ARVs.

Keywords: atazanavir, abacavir, nevirapine, ritonavir, lopinavir, zidovudine, darunavir, efavirenz, HPLC-MS/MS, chemical and toxicological analysis.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov have developed an analytical method, Daria D. Stolyarova, Olga A. Miskiv, Dana S. Bogdanova have performed a literature review, sample preparation and sample analysis by HPLC-MS/MS, Maria V. Belova have developed of the scientific direction of the study and provided samples for analysis, Igor E. Shohin, Irina M. Korenskaya and Yuri V. Medvedev and other authors have participated in the discussion of the results.

For citation: Komarov T. N., Belova M. V., Stolyarova D. D., Shohin I. E., Bogdanova D. S., Miskiv O. A., Medvedev Yu. V., Korenskaya I. M. Chemical and toxicological analysis of antiretroviral drugs. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 53–60.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) остается главной социально значимой инфекцией во всем мире. На глобальном уровне это заболевание с момента регистрации первых случаев заражения уже унесло более 35 млн человеческих жизней, в 2017 году от причин, связанных с ВИЧ, во всем мире умерло около 1 млн человек. На начало 2019 года кумулятивное количество зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции среди граждан РФ составило 1 326 239 человек, в стране проживало 1 007 369 зарегистрированных россиян с верифицированным диагнозом «ВИЧ-инфекция», исключая 318 870 умерших больных [1].

ВИЧ-инфицированным пациентам оказывается медицинская помощь, в том числе фармакотерапия антиретровирусными препаратами (АРВ). Как и все лекарственные препараты, АРВ имеют ряд побочных действий, которые стоит брать во внимание при их назначении в составе высокоактивной антиретровирусной терапии. Нередки случаи, когда побочные действия АРВ становились причиной поступления пациентов в отделение токсикологии. Также многие АРВ могут влиять на фармакокинетику совместно принимаемых лекарственных и наркотических веществ. В результате этого могут возникать нежелательные токсические состояния.

Найдено упоминание о клиническом случае острого экзогенного отравления препаратом Ретровир (МНН Зидовудин) у новорожденного ребёнка, ВИЧ-инфицированного внутриутробно. Отравление произошло непреднамеренно в связи с превышением разовых и суточной доз зидовудина в течение 2 дней и выразилось в диарее (до 10 раз в сутки), острой почечно-печеночной недостаточности, поражении нервной системы и кожных покровов. Обращает на себя внимание случай выраженных психоневрологических расстройств у пациента 33-х лет при комплексной АРВ терапии (эфовиренз, тенофовир, эмтрицитабин) связанные с генетически обусловленной ферментопатией – нарушением функции CYP2B6 [3].

Таким образом, проблема острых отравлений АРВ актуальна на сегодняшний день. Причинами интоксикации данными препаратами могут быть: несоблюдение режима дозирования (то есть непреднамеренное отравление), генетические отклонения в системе цитохрома P450, а также осознанное потребление повышенных доз с целью суицида.

Цель исследования: разработать скрининг-анализ антиретровирусных препаратов в моче методом ВЭЖХ-МС/МС для идентификации данных веществ при проявлении побочных эффектов и острых отравлений ими, а также для контроля почечной экскреции при терапевтическом приеме АРВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Для идентификации абакавира, зидовудина, невирапина, эфовиренза, атазанавира, дарунавира, лопинавира, ритонавира в моче человека использовался жидкостной хроматограф Nexera XR с tandemным масс-селективным детектором LCMS-8040 («Shimadzu Corporation», Япония). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения Lab Solutions (Ver. 5.91) «Shimadzu Corporation», Япония.

Реактивы

Были использованы следующие реактивы: вода Milli-Q; ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Panreac, Испания); метанол (класс «UHPLC-grade», J.T.Baker, Нидерланды); муравьиная кислота (класс «for LC-MS», Merck Millipore, США); трифторуксусная кислота (класс «for synthesis», Panreac, Испания).

Стандартные растворы

Для приготовления рабочего раствора были использованы стандартные образцы абакавира сульфата (USP Reference Standard), зидовудина (USP Reference Standard), невирапина (USP Reference Standard), эфовиренза (USP Reference Standard), атазанавира сульфата, (USP Reference Standard), дарунавира (Sigma, содержание 98,0 %), лопинавира (USP Reference Standard), ритонавира (USP Reference Standard).

Смешанный рабочий раствор абакавира, зидовудина, невирапина, эфовиренза, атазанавира, дарунавира, лопинавира и ритонавира готовили путем растворения навесок субстанций в метаноле, разведением и смешиванием исходных стандартных растворов до концентраций 1000 нг/мл каждого вещества в смешанном растворе.

Биологическая матрица

В качестве биологической матрицы была выбрана моча человека. АРВ препараты из выбранной группы преимущественно выводятся почками как в качестве конъюгатов с глюкуроновой кислотой, так и в неизменном виде. Это делает возможным определить наличие данных лекарственных веществ непосредственно в моче пациента при употреблении с целью преднамеренной или случайной (при несоблюдении режима дозирования) интоксикации, а также при терапевтическом применении данных АРВ пациентом для контроля почечной экскреции веществ или при сочетании терапевтического приёма данных АРВ с отравлениями другими веществами.

Пробоподготовка

Модельные образцы мочи с содержанием исследуемых веществ готовили смешиванием 270 мкл интактной мочи и 30 мкл смешанного рабочего раствора.

К 300 мкл мочи пациента (или к 300 мкл интактной мочи для приготовления бланкового образца), помещённым в центрифужные микропробирки типа «Eppendorf» вместимостью 2 мл, прибавляли 900 мкл метанола, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 13500 об/мин. Далее 500 мкл супернатанта переносили в хроматографические вials и помещали в автосамплер хроматографа.

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: YMC Hydrosphere C18, 100 × 2,1 мм; S = 3 мкм.
- Температура термостата: 40 °C.
- Подвижная фаза: элюент А: вода Milli-Q, элюент В: ацетонитрил.
- Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 1.

Таблица 1. Градиентное элюирование

Table 1. Gradient elution

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0,00	90	5	0,5
1,50	90	5	
6,00	58	100	
7,50	0	100	
8,00	0	5	
11,00	90	5	

- Объем вводимой пробы: 5 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0–11 мин.
- Параметры источника ионизации: распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 20 л/мин, температура блока нагрева 350 °C, напряжение на капилляре +4,5 кВ.
- Масс-спектрометрическое детектирование проводилось в режиме MRM (Multiple Reaction Monitoring). Осуществлялась регистрация m/z иона-предшествен-

ника на первом аналитическом квадруполе Q1 и m/z ионов-продуктов на втором аналитическом квадруполе Q3. Условия масс-спектрометрического детектирования анализируемых веществ представлены в таблице 2.

Таблица 2. Условия масс-спектрометрического детектирования исследуемых веществ

Table 2. The conditions of mass-spectrometric detection of the investigated substances

Исследуемое вещество	Ион-предшественник (Precursor m/z)	Ион-продукт (Product m/z)	Режим ионизации
Атазанавир	705,50	335,20	+
		168,10	
Абакавир	287,15	191,10	+
		150,05	
Невирапин	267,10	226,05	+
Ритонавир	721,30	296,15	+
		268,15	
Лопинавир	629,40	429,20	+
		183,10	
		155,10	
Зидовудин	268,15	127,05	+
		109,90	
Дарунавир	548,35	392,20	+
		156,05	
		69,15	
Эфавиренз	314,05	244,20	–
		250,30	

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики пробоподготовки

В качестве исходного объекта для идентификации АРВ была выбрана моча. Преимущества использования данного биообъекта заключаются в следующем:

- Доступность больших количеств биоматериала.
- Возможность неинвазивного способа отбора образца, не требующего специально сертифицированных помещений и обученного персонала (как при отборе крови).
- Концентрирование анализируемых АРВ в моче. В результате выведения лекарств почками, в моче происходит накопление как нативных веществ, так и их метаболитов. Их концентрация в этом биообъекте может превышать концентрацию в крови в несколько раз.
- Отсутствие вирусной нагрузки мочи как биологического объекта. Концентрация ВИЧ в моче недостаточна для заражения. Исключения возможны лишь при контаминации мочи кровью, слизью или иными инфицированными выделениями.

В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения как наиболее быстрый и удобный в применении, что особенно актуально в случае работы с диагностикой острых отравлений. Для выбора оптимального осаждающего реагента были проведены

различные варианты пробоподготовки, использующие в качестве осадителя ацетонитрил, метанол и 50 % водный раствор трифторуксусной кислоты (TFA). В результате анализа было отмечено, что наиболее приемлемые результаты с точки зрения последующего хроматографического разделения и воспроизводимости были получены при использовании метанола в качестве осадителя. Данный осаждающий реагент в отличие от ацетонитрила обладает гидрофильными свойствами ($\log P \text{ CH}_3\text{OH} = -0,77$) в большей степени [4], поэтому он хорошо извлекает из матрицы зидовудин ($\log P = 0,05$) [5] и абакавир ($\log P = 1,1$) [6]. Также метанол в отличие от TFA не взаимодействует с исследуемыми АРВ. Из дополнительных преимуществ метанола над другими осадителями следует отметить, что он способен инактивировать ВИЧ в случае контаминации биологического объекта.

Разработка методики хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования

В качестве неподвижной фазы была использована хроматографическая колонка YMC Hydrosphere C18 с модифицированным октадецилсиликагелем. Данный сорбент позволяет эффективно разделять вещества, различные по своим липофильным свойствам, что актуально в анализе данной группы веществ.

Поскольку исследуемые вещества преимущественно являются органическими основаниями, изначально было решено использовать элюенты с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты для повышения ионизации данных веществ в масс-спектрометрическом детекторе (рисунок 1). В ходе подбора условий хроматографического разделения было установлено, что кислый элюент приводит к уменьшению времени удерживания отдельных веществ и смещению их пиков к мертвому времени хроматографической системы. Это снижает эффективность хроматографического разделения и может привести к получению ложноположительных результатов в случае присутствия в моче метаболитов, совпадающих по молекулярным массам, а также схожих по структуре и по путям фрагментации с нативными веществами.

Для повышения буферной емкости элюента были использованы такие модификаторы как формиат аммония, ацетат аммония (рисунок 2), которые также не решили проблему, описанную выше. Использование элюентов без дополнительных модификаторов привело к повышению эффективности разделения исследуемых веществ, при этом незначительно снизив их ионизацию в электропреемнике. На рисунке 3 представлена хроматограмма модельного образца, демонстрирующая пики всех исследуемых АРВ с подобранными условиями хроматографического разделения. Хроматограмма образца интактной мочи представлена на рисунке 4. Она демонстрирует, что в предложенных хроматографических условиях не обнаруживается интерференции пиков исследуемых веществ с фоновыми пиками эндогенных соединений биологической матрицы (мочи).

Применение разработанной методики в диагностике острых отравлений

Разработанная методика была применена в анализе образцов мочи, полученных из Научно-исследовательского института (НИИ) скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, от ВИЧ-положительных пациентов, поступивших в отделение острых отравлений и соматопсихиатрических расстройств (ООСПР) с признаками отравления АРВ. Данные о пациентах и результаты скрининга представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты анализа полученных образцов

Table 5. The results of the analysis of obtained samples

№ п/п	Возраст	Пол	Предполагаемый токсикант	Идентификация
1	28	ж	абакавир	+
2	37	м	зидовудин	+
3	35	м	эфавиренз	+
4	42	ж	абакавир	+
5	34	м	атазанавир	+
6	32	ж	эфавиренз	+

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика идентификации атазанавира, абакавира, невирапина, ритонавира, лопинавира, зидовудина, дарунавира и эфавиренза в моче человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработанная методика может быть использована для идентификации данных веществ как возможных токсикантов при отравлениях. Перспектива развития темы: расширение группы анализируемых веществ, разработка методики количественного определения исследуемых АРВ в биологических жидкостях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рындич А. А., Сухова А. Г., Суладзе А. Г., Твердохлебова Т. И., Воронцов Д. В. Тенденции и факторы развития эпидемиологического процесса ВИЧ-инфекции на юге России. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2019; 11(2): 48–57. DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-2-48-57.
2. Rotger M., Colombo S., Furrer H. et al. Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15: 1–5.
3. Сапожников В. Г., Коняхина А. П. Последствия острого экзогенного отравления препаратом Ретровир (клиническое наблюдение). *Вестник новых медицинских технологий*. 2016; 23(4): 188–196.
4. PubChem. Methanol. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methanol#section=Octanol-Water-Partition-Coefficient>.
5. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00495>.
6. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01601>.

REFERENCES

1. Ryndich A.A., Sukhova A.G., Suladze A.G., Tverdokhlebova T.I., Vorontsov D.V. HIV epidemic trends and development factors in southern Russia. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2019; 11(2): 48–57. DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-2-48-57 (in Russ.).
2. Rotger M, Colombo S, Furrer H, et al. Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 1–5.
3. Sapozhnikov V.G., Konyakhina A.P. The consequences of acute exogenous poisoning with the drug Retrovir (clinical observation). *Bulletin of new medical technologies*. 2016; 23(4): 188–196 (in Russ.).
4. PubChem. Methanol. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methanol#section=Octanol-Water-Partition-Coefficient>.
5. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00495>.
6. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01601>.

Sample Name : sample 0,1% FA
Month-Day Acquired : 26.02.2019
Time Acquired : 14:49:11
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 5
Method File : anti_HIV_id.lcm

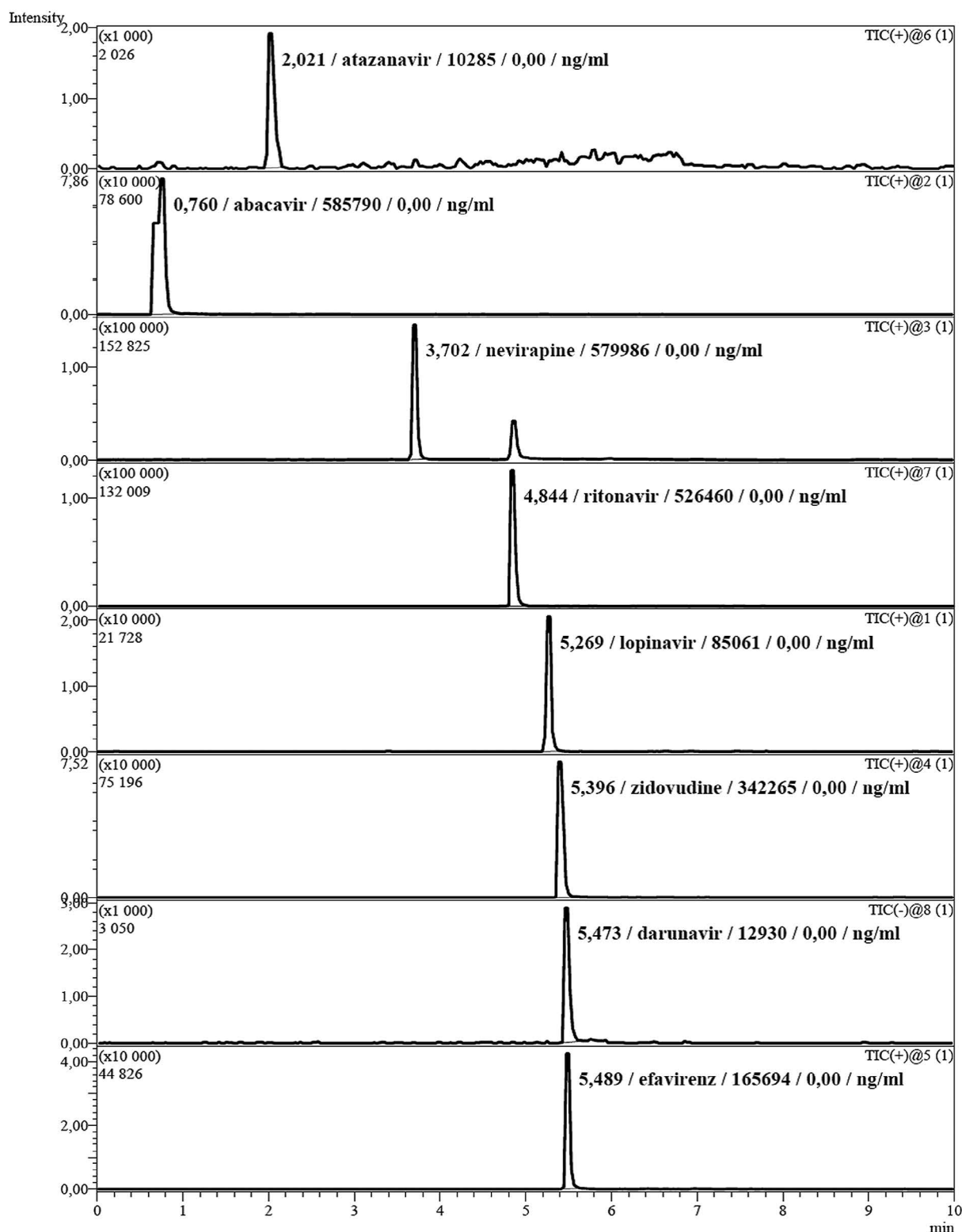


Рисунок 1. Хроматограмма модельного образца с использованием в качестве элюента А 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты

Figure 1. Chromatogram of a model sample using 0.1 % formic acid as a eluent A

Sample Name : sample 10 mM NH₄COOH
Month-Day Acquired : 26.02.2019
Time Acquired : 15:07:14
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 5
Method File : anti_HIV_id.lcm

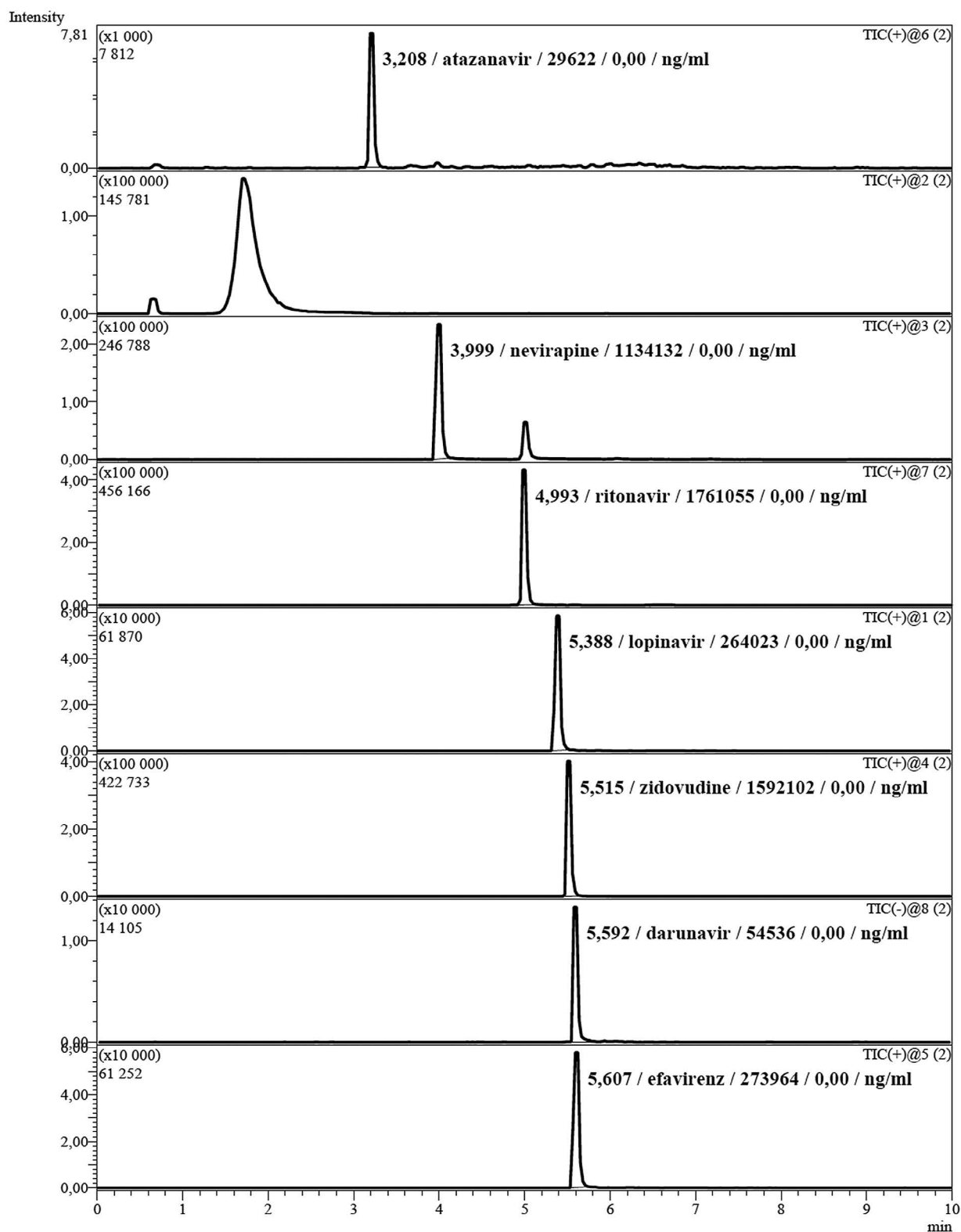


Рисунок 2. Хроматограмма модельного образца с использованием в качестве элюента А 10 мМ водного раствора аммония ацетата
Figure 2. Chromatogram of a model sample using 10 mM ammonium acetate solution as a eluent A

Sample Name : Sample H20/ACN
Month-Day Acquired : 26.02.2019
Time Acquired : 15:32:30
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 5
Method File : anti_HIV_id.lcm

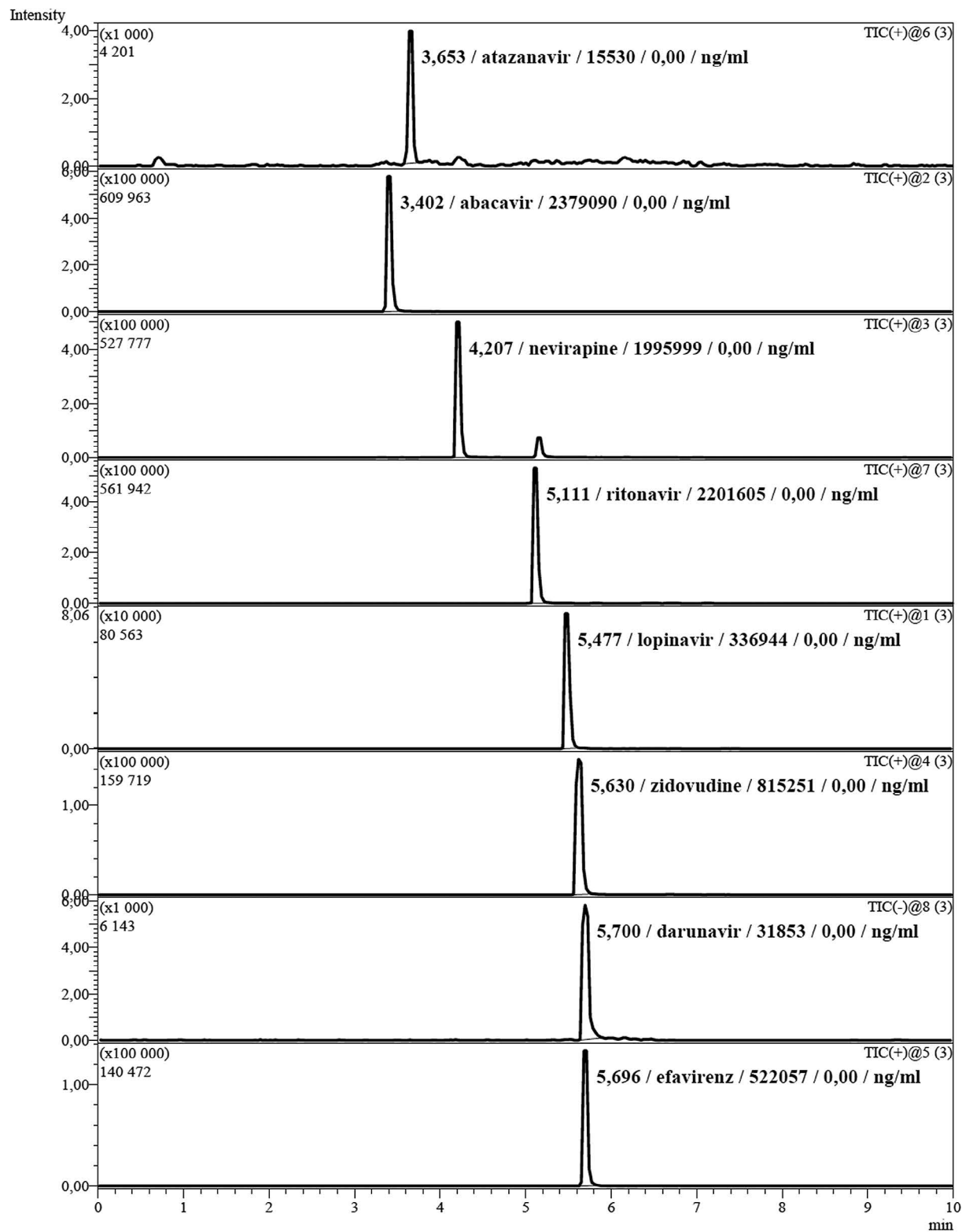


Рисунок 3. Хроматограмма модельного образца без использования модификаторов подвижной фазы

Figure 3. Chromatogram of the model without the use of modifiers

Sample Name : urine blank
Month-Day Acquired : 26.02.2019
Time Acquired : 16:09:27
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 5
Method File : anti_HIV_id.lcm

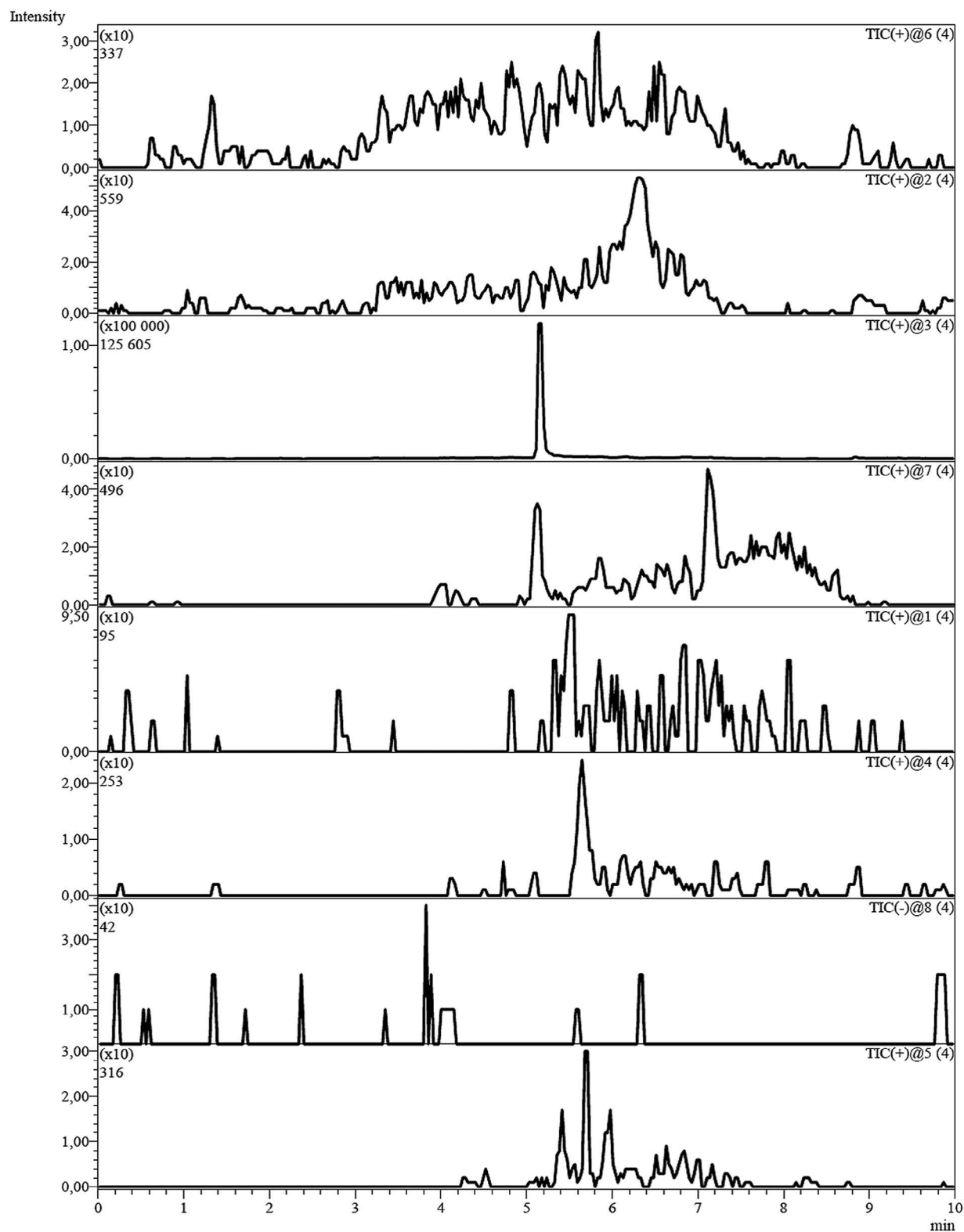


Рисунок 4. Хроматограмма образца интактной мочи

Figure 4. Chromatogram of a blank urine sample