

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТА ЛИДОКАИНА – МОНОЭТИЛГЛИЦИНКСИЛИДИДА В ПЛАЗМЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИОДНО-МАТРИЧНОГО ДЕТЕКТОРА

Н. В. Рогова, К. А. Кузнецов, Л. А. Смирнова, А. А. Озеров
Кафедра клинической фармакологии ВолГМУ

Описан простой, точный и чувствительный способ количественного определения моноэтилглицинксилидида в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для количественного определения использовался внутренний стандарт – триметоприм. Получена линейная зависимость в промежутке концентраций 20-1000 нг/мл с пределом чувствительности 10 нг/мл. Метод показал точные и повторяемые результаты.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, моноэтилглицинксилидид.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF LIDOCAINE METABOLITE MONOETHYLGLYCINEXYLYDIDE IN SERUM BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY USING DIODE-MATRIX DETECTOR

N. V. Rogova, K. A. Kuznetsov, L. A. Smirnova, A. A. Ozerov

Abstract. A simple, accurate and sensitive method of analysis of monoethylglycinexylydide (MEGX) in human serum by high-performance liquid chromatography is described. MEGX was measured after direct injection upon addition of the internal standard (trimethoprim). The procedure produced linear curves for the concentration range of 20-1000 ng/ml with a limit of detection 10 ng/ml. This assay produced accurate and repeatable results.

Key words: high-performance liquid chromatography, monoethylglycinexylydide.

В настоящее время для лечения любого заболевания практически невозможно обойтись монотерапией и приходится прибегать к назначению одновременно нескольких лекарственных средств. Проблема нежелательных реакций при межлекарственном взаимодействии на уровне биотрансформации в печени является актуальной.

Цитохромы подсемейства IIIA составляют 30 % от всех изоферментов цитохрома P450 в печени и 70 % всех изоферментов стенки желудочно-кишечного тракта, при этом в печени локализован преимущественно изофермент 3A4 (CYP3A4). CYP3A4 метаболизирует около 60 % всех известных лекарственных веществ, катализирует реакцию 6-β-гидроксилирования эндогенных и экзогенных стероидов, в том числе тестостерона, прогестерона, кортизола. На активность CYP3A4 влияют многие факторы, которые необходимо учитывать.

Субстратная специфичность определенных ферментов метаболизма лекарственных средств позволила разработать методы их фенотипирования. Активность того или иного фермента метаболизма определяется по фармакокинетике специфического "маркерного" субстрата путем измерения его концентрации и концентрации его метаболита в плазме крови (или моче). Маркер-

ными субстратами для определения активности CYP3A4 являются дапсон, эритромицин, нифедипин, лидокаин [1, 8].

В настоящее время наиболее широко в качестве маркера активности CYP3A4 применяется лидокаин и его метаболит – моноэтилглицинксилидид (MEGX). Для определения концентрации MEGX в данном тесте применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), в котором в качестве стандарта используется субстанция MEGX [7].

Применение MEGX-теста в клинике имеет очень важное значение. Например, для диагностики хронической патологии печени (значение MEGX на 30-й минуте после введения лидокаина 50 мкг/л предложено использовать как дифференциально-диагностический критерий между хроническим гепатитом и циррозом печени); для прогнозирования исхода заболевания (значение концентрации MEGX <25 мкг/л является критерием, позволяющим судить о высокой вероятности смертельного исхода при первичном билиарном циррозе) [9]; для оценки состояния донора при трансплантации печени (при показаниях MEGX на 15-й минуте (90±9) мкг/л у донора – высокий риск осложнений в послеоперационном периоде у реципиента) [10]; для оценки фармакокинетического взаимодействия лекарств на уровне био-

трансформации (снижение концентрации MEGX на 20 % и более требует коррекции дозирования лекарственных средств, являющихся субстратами CYP3A4). Таким образом, мониторинг функционального состояния CYP3A4 и организма в целом при помощи MEGX-теста позволяет улучшить качество лечения пациентов, повысить длительность и качество их жизни, сократить расходы на лечение.

Существует несколько вариаций определения MEGX в плазме крови для различных условий хроматографирования. В частности, для детектирования определяемых веществ используются различные методики: с использованием флуоресцентного детектора, масс-спектропии, иммуноферментного анализа [2, 3, 11]. Использование флуоресцентного детектора и масс-спектропии требует наличия дорогостоящего оборудования и реактивов, что препятствует широкому распространению данного метода. В литературе в основном описаны методики определения концентрации MEGX и лидокаина с использованием ультрафиолетового детектора [5–7]. В связи с этим нами предложен метод определения концентраций лидокаина и MEGX с использованием ВЭЖХ с диодно-матричным детектором как наиболее распространенным и доступным.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Адаптировать методику количественного определения основного метаболита лидокаина (моноэтилглицинксилидида) для условий ВЭЖХ с диодно-матричным детектором.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовались следующие реагенты: раствор лидокаина 10 %-й производства Московского фармкомбината им. Семашко; MEGX – синтезирован по методике синтеза лидокаина (под руководством проф., д-ра хим. наук А. А. Озерова); раствор триметоприма 16 мг/мл (препарат "Бисептол" для внутривенных инфузий) производства завода "Polfa Warsaw".

Все используемые растворы готовились ежедневно в день исследования. Требуемые концентрации готовились из маточных растворов (1000 мкг/мл) методом последовательных разведений. Для экспериментов готовились серии из 3 параллельных проб по каждой концентрации. Для построения калибровочных кривых использовался средний результат параллельных проб.

Мы использовали высокоэффективный жидкостной хроматограф модели "HPLC-10Avp" ("Shimadzu Co., Ltd.", Kyoto, Japan), оборудованный диодно-матричным детектором "SPD-M10A" ("Shimadzu Co., Ltd.", Japan) и инжектором "Rheodyne" модели 7725i с петлей ввода на 20 мкл (Rheodyne, Cotati, CA 94928), хроматографи-

ческая колонка "SupelcoSil LC-8" (7,5 см × 4,6 мм со средним размером частиц 3 μm).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

За основу методики определения MEGX была взята методика, предложенная на кафедре клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ММА им. Сеченова (Кукес В. Г.). В качестве мобильной фазы была использована смесь ацетонитрила для ВЭЖХ и буферного раствора в соотношении 87:13. Условия хроматографирования: температура – 25 °С, длина волны – 205 нм, скорость потока – 1 мл/мин.

Для подбора методики с наибольшей чувствительностью использовались следующие буферные растворы с различными значениями pH: калий-фосфатный буфер (раствор KH_2PO_4 , pH = 7,2); калий-фосфатный буфер (pH = 5,9); цитратно-фосфатный буфер (pH = 5,0); натрий-фосфатный буфер ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH = 4,65); калий-фосфатный буфер (раствор KH_2PO_4 , pH = 4,0). Для определения чувствительности использовалась тестовая проба 20 мкл раствора MEGX 10 мкг/мл.

Исходя из того, что MEGX – вещество основной природы и в кислой среде будет находиться в виде соли, что будет препятствовать определению, первоначально нами был выбран калий-фосфатный буфер (pH = 7,2). При испытании тестовой пробы выяснилась недостаточная чувствительность данного метода – пики на хроматограмме получаются нечеткими и растянуты-

ми по времени, что препятствует количественному определению. Использование калий-фосфатного буфера с более низкими значениями pH (5,9) также показало недостаточную чувствительность. Так как чувствительность метода может зависеть не только от pH, но и от состава буфера, были опробованы цитратно-фосфатный (pH = 5,0) и натрий-фосфатный (pH = 4,65) буферы, которые также показали низкую чувствительность. В некоторых работах [5] используется калийфосфатный буфер с более низким pH (4,0). При испытании тестовой пробы он показал наибольшую чувствительность по сравнению с остальными. В результате для нашей методики мы решили остановиться на следующем составе мобильной фазы: 87 % ацетонитрила и 13 % калий-фосфатного буфера (pH = 4,0) как наиболее чувствительной среди опробованных (рис. 1).

Тестовая проба 10 мкг/мл MEGX дает на хроматограмме пик высотой в 30 ед. В крови человека концентрации MEGX находятся в диапазоне 20–100 нг/мл, т. е. при концентрации 100 нг/мл пик MEGX на хроматограмме будет сливаться с нулевой линией. В связи с этим нами было предложено производить концентрирование исходного раствора (экстракция раствора, упаривание и растворение сухого остатка в меньшем объеме растворителя), что позволит значительно увеличить чувствительность.

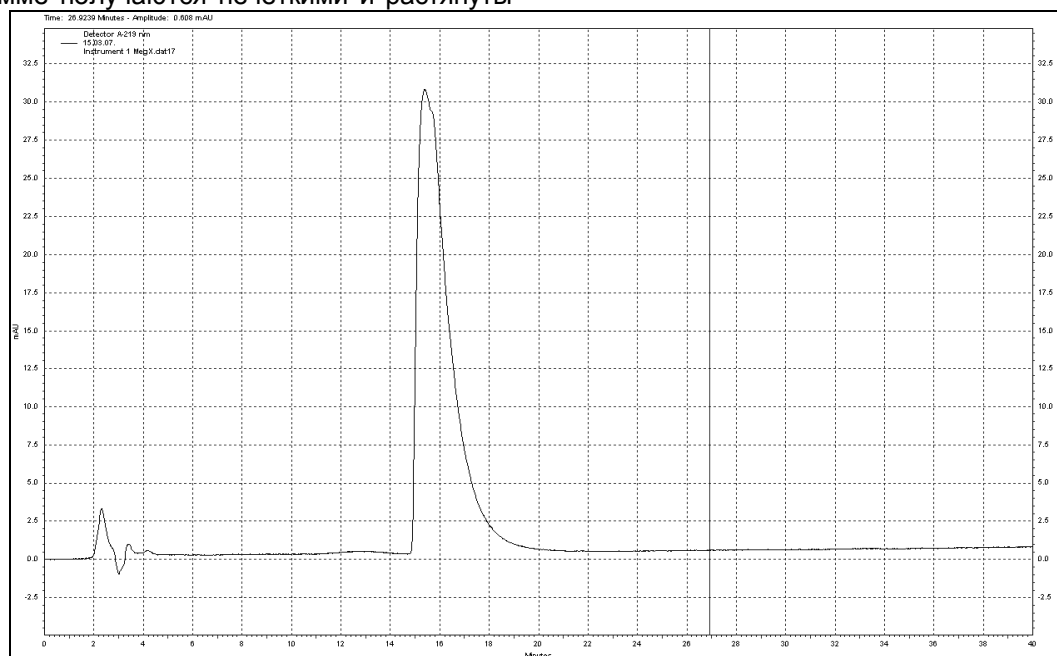


Рис. 1. Хроматограмма раствора MEGX 10 мкг/мл

Впервые для экстракции MEGX из раствора нами была предложена экстракция хлороформом – доступным и недорогим реагентом, относительно малотоксичным (в отличие от используемого в других методиках дихлорметана).

Экстракцию проводили следующим образом. К 5 мл раствора MEGX 50 нг/мл добавляли 2 капли 0,1N раствора NaOH (для повышения pH и соответственно перевода MEGX в основную форму) и по 1 мл хлороформа, встряхивали на

vortex в течение 1 минуты, после чего центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 минут. Затем нижний (органический) слой количественно переносили в пустую пробирку. Данный процесс экстракции повторяли 3 раза с одним образцом. Полученные экстракты затем объединяли в одну пробу. После каждой экстракции оценивалось оставшееся количество MEGX в водной фазе. Выяснилось, что после трехкратной экстракции в водном растворе остаются неопределяемые концентрации MEGX, что позволяет говорить о практически полном переходе MEGX в органическую фазу. Полученный экстракт испаряли методом барботирования, после чего сухой остаток растворяли в ацетонитриле для ВЭЖХ.

Тестовая проба показала значительное увеличение чувствительности, однако повышение чувствительности оказалась недостаточным. Мы предположили, что MEGX плохо растворяется в ацетонитриле и, следовательно, не полностью переходит в раствор из сухого остатка. В связи с этим нами был предложен в качестве растворителя этанол. При его использовании удалось еще более повысить чувствительность метода.

В связи с увеличением количества стадий пробоподготовки, на каждой из которых возможны потери определяемого вещества, необходимо использовать внутренний стандарт для учета этих потерь и определения изначальной концентрации вещества в растворе.

По литературным данным в качестве внутреннего стандарта при определении MEGX ис-

пользуются различные вещества, основными критериями использования которых является определяемость при тех же условиях хроматографирования, причем время выхода не должно совпадать с определяемыми веществами.

В качестве внутреннего стандарта на основании сходства физико-химических свойств нами были опробованы следующие вещества – адреналин, новокаин, дибазол и триметоприм.

Используемые нами условия хроматографирования показали очень низкую степень чувствительности метода по отношению к дибазолу и новокаину, что препятствует их использованию в качестве внутреннего стандарта. По отношению к адреналину метод, напротив, показал очень высокую чувствительность, но использованию адреналина в качестве внутреннего стандарта препятствует очень маленькое время удерживания, в результате чего четко определить границы пика на хроматограмме не представляется возможным и, помимо этого, возможно присутствие эндогенного адреналина в плазме крови человека, что, учитывая высокую чувствительность метода к нему, будет оказывать заметное влияние на точность определения. Вышеперечисленных недостатков при использовании в качестве внутреннего стандарта лишен триметоприм – его время выхода заметно отличается от времени выхода определяемого MEGX, чувствительность метода к триметоприму оказалась вполне достаточной и сравнимой с такой же для MEGX (рис. 2).

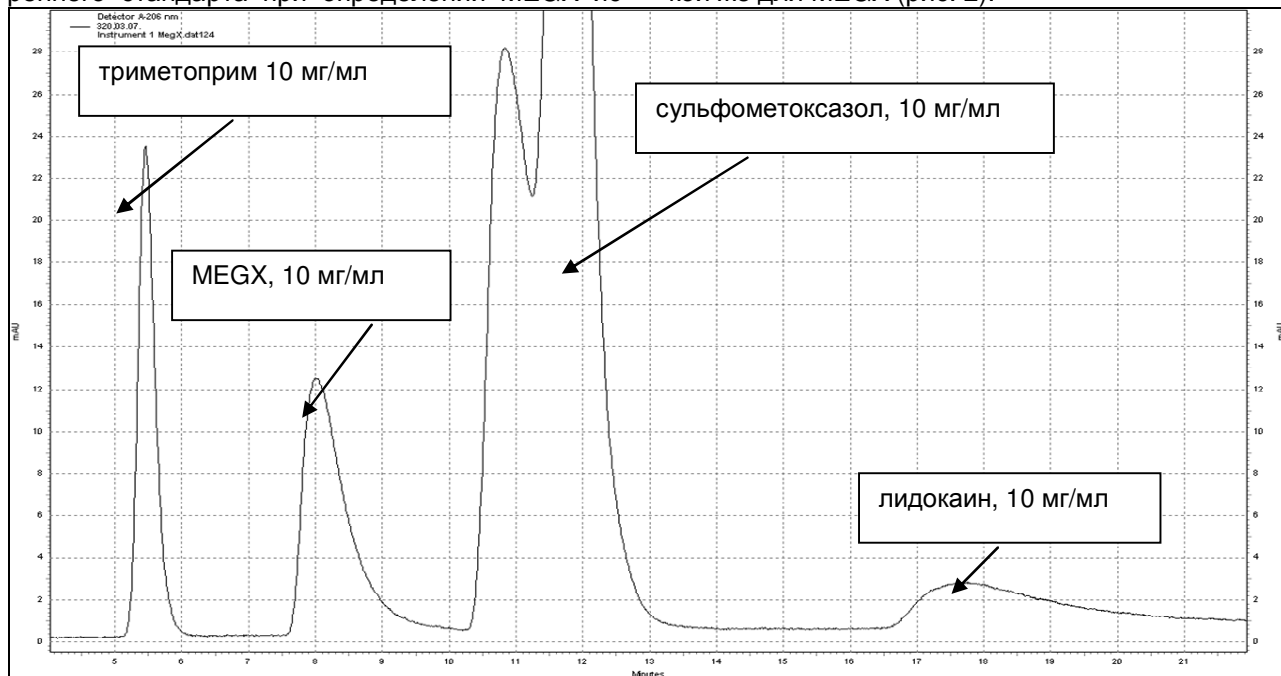


Рис. 2. Хроматограмма смеси MEGX, триметоприма, сульфометоксазола и лидокаина

Для оценки линейности зависимости между площадями пиков и концентрациями триметоприма и MEGX в водном растворе был построен

калибровочный график зависимости площади пика MEGX и триметоприма от концентрации и график зависимости площади пика MEGX от площа-

ди пика внутреннего стандарта в тех же концентрациях. Используемые концентрации – 20, 10, 5, 1 мкг/мл (рис. 3):

Ошибка! Объект не может быть создан из кодов полей редактирования.

Рис. 3. Зависимость $S(M)$ от $S(T)$

Из представленного графика видно, что зависимость получается линейной с коэффициентом аппроксимации $>0,999$, что позволяет использовать триметоприм в качестве внутреннего стандарта.

В дальнейшем необходимо было адаптировать вышеописанную методику концентрирования водных растворов к аналогичной методике, но используя плазму крови человека.

Для этого нами была использована плазма крови практически здоровых людей, не употребляющих какие-либо лекарственные препараты в течение последних 2 недель. Процедура пробоподготовки аналогична таковой для водного раствора. Чувствительность метода оказалась сопоставима с таковой при использовании водного раствора.

Для проверки повторяемости результатов каждую пробу определяли 3 раза и рассчитывали среднее значение и внутридневную ошибку. Для проверки воспроизводимости результатов анализ образцов повторяли в течение 3 дней и рассчитывали среднее значение и междневную ошибку.

Для количественной оценки содержания MEGX в образце плазмы была построена калибровочная кривая зависимости отношения площади пика триметоприма к площади пика MEGX от концентрации последнего (концентрация триметоприма была постоянной во всех пробах и составляла 1 мкг/мл).

Данный метод показал линейную зависимость в промежутке концентраций 20–1000 нг/мл, что позволяет использовать его для количественного определения MEGX с минимальным порогом обнаружения – 10 нг/мл. Метод показал высокую степень повторяемости и воспроизводимости результатов, меж- и внутридневная ошибка не превышает 5 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами была адаптирована методика количественного определения MEGX методом ВЭЖХ для хроматографической системы "Shimadzu" с диодно-матричным детектором. Данная методика позволяет определять MEGX в плазме крови в концентрациях 20–100 нг/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кукес В. Г., Фисенко В. П. Метаболизм лекарственных препаратов. – М., 2004.
2. Andreeva M., Niedmann P.-D., et al. // Clin. Chem. – 1997. – Vol. 43 (6). – P. 1081–1083.
3. Chen Y., Potter J. // Clin. Chem. – 1992. – Vol. 38. – P. 2426–2430.
4. Chen Y., Potter J. // J. Chromatogr. – 1992. – Vol. 574. – P. 361–364.
5. Cox S., Hamner T., et al. // J. Pharm. and Biomed. Anal. – 2005. – Vol. 37. – P. 801–804.
6. Kohda Y., Kakiuchi Y., et al. // J. Appl. Ther. Res. – 1998. – Vol. 2. – P. 33–38.
7. Lehmann U., Armstrong V., et al. // Therap. Drug Monit. – 1995. – № 17 (2). – P. 125–132.
8. Nebert D. W., Russel D. W. // Lancet. – 2002. – Vol. 360. – P. 1155–1162.
9. Oellerich M., Burdelski M., et al. // Там же. – 1989. – Vol. 1. – P. 640–642.
10. Oellerich M., Burdelski M., et al. // Therap. Drug Monit. – 1990. – № 12 (3). – P. 219–286.
11. Streit F., Niedmann P.-D., et al. // Clin. Chem. – 2001. – Vol. 47 (10). – P. 1853–1856.

УДК 616.33–085.31:614.2

ФАРМАКОЭКОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С НЕЭРОЗИВНОЙ ФОРМОЙ ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ БОЛЕЗНИ В ОБЩЕЙ ВРАЧЕБНОЙ ПРАКТИКЕ

М. М. Осадчук

Самарский государственный медицинский университет

В работе описан фармакоэкономический анализ лечения пациентов с неэрозивной формой гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. Разработаны алгоритмы лечения больных с учетом их социального статуса.

Ключевые слова: гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, лечение, общая врачебная практика.

PHARMACOECONOMIC ANALYSIS OF TREATMENT OF PATIENTS WITH NON-EROSIVE FORM OF GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE IN GENERAL MEDICAL PRACTICE