

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОКАИНАМИДА В МОЧЕ КАК ТЕСТ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФЕНОТИПА АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

С.Ю. Гармонов¹, Л.К. Нугбиенью¹, И.А. Салахов¹, Т.А. Киселева², С.В. Бухаров¹,

¹ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»,

²ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет»

Гармонов Сергей Юрьевич – e-mail: serggar@mail.ru

Установлены условия одновременного хроматографического определения прокаинамида и его ацетильного метаболита в моче на нормально-фазном сорбенте Discovery C18 30*3 мм 5 мкм. Оптимальные результаты определений достигаются при использовании подвижной фазы состава ацетонитрил 0,005M NaH₂PO₄, pH 3,0 в присутствии ион-парного реагента 0,005M додецилсульфата натрия и диодно-матричного детектирования при аналитической длине волны 282 нм. Показана возможность использования разработанной методики для оценки индивидуальных фенотипов метаболизма процессов ацетилирования прокаинамида у человека на основе установления индивидуальных фармакокинетических параметров при его экскреции с мочой.

Ключевые слова: прокаинамид, метаболизм, моча, высокоэффективная жидкостная хроматография, фенотип ацетилирования.

Conditions were established for the simultaneous chromatographic determination of procainamide and its acetylated metabolite in urine with a normal-phase Discovery C18 column (30*3 mm, 5 μm). Optimal results were achieved, using mobile phase composed of acetonitrile, 5 mM phosphate buffer, pH 3.0, in the presence of an ion-pair reagent (5 mM SDS), and diode-matrix analytical detection at wavelength of 282 nm. The possibility of using the developed technique was demonstrated for the assessment of individual phenotypes of the metabolic process of acetylation of procainamide in humans, based on the establishment of individual pharmacokinetic parameters of the excretion of the drug in urine.

Key words: procainamide, metabolism, urine, high-performance liquid chromatography, acetylator phenotype.

Введение

Метаболизм лекарственных средств (ЛС) осуществляется путем реакций химической модификации (фаза I – окисление, восстановление, гидролиз) и конъюгации с эндогенными соединениями (фаза II – ацетилирование, сульфатация, глюкоронизация) при участии различных ферментативных систем [1]. Путем N-ацетилирования происходит биотрансформация ЛС, содержащих аминные функциональные группы и у человека сформированы фенотипы быстрого и медленного метаболизма, различающиеся генетически детерминированной индивидуальной активностью N-ацетилтрансферазы гепатоцитов. Для практики персонализированной медицины предложены способы оценки интенсивности ацетилирования, основанные на хроматографическом и спектрофотометрическом определении различных тест-препаратов (например, изо니아зид, сульфаниламиды, кофеин) при выведении с мочой и изучении уровня их содержания в крови [1, 2].

В организме под действием ацетилирующих ферментов прокаинамид метаболизируется, образуя ацетильный метаболит. При этом биотрансформация прокаинамида в организме человека контролируется ферментом N-ацетилтрансферазой [1]. Прокаинамид представляет собой антиаритмический препарат, оказывающий мембраностабилизирующее действие, он снижает возбудимость миокарда предсердий и желудочков. Ацетильный метаболит также обладает выраженной активностью анти-

аритмических лекарственных средств. Около 25% введенного ЛС превращается в метаболит, однако при быстром ацетилировании или хронической почечной недостаточности превращению подвергаются и большие дозы. При хронической почечной и сердечной недостаточности метаболит быстро накапливается в крови до токсических концентраций, при этом концентрация прокаинамида остается в допустимых пределах [3].

В то же время для оптимизации режимов дозирования, предотвращения побочных эффектов необходимы способы оценки фенотипов ацетилирования при использовании прокаинамида как фармакогенетического маркера. При этом выбор надлежащего аналитического метода для количественного определения прокаинамида в биологических образцах играет важную роль в оценке и интерпретации его биодоступности, биоэквивалентности и индивидуальных различий в фармакокинетических данных.

Для количественного определения прокаинамида в различных биологических матрицах описаны спектрофотометрические и хроматографические методы [2, 4, 5]. Однако в настоящее время в литературе не представлены способы оценки интенсивности процессов ацетилирования прокаинамида при его экскреции с мочой.

Цель исследования состояла в изучении возможности оценки фенотипа ацетилирования при экскреции прокаинамида с мочой человека методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

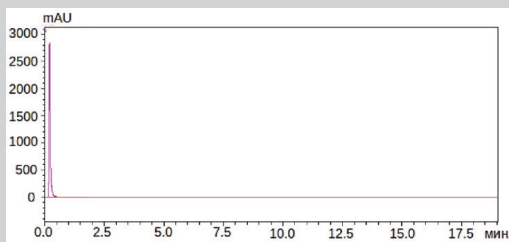


РИС. 1. Хроматорграмма мочи человека до приема препарата в условиях ВЗЖХ анализа, ПФ ацетонитрил – 0,005М C₁₂H₂₅NaSO₄, 0,005М NaH₂PO₄, pH 3,0 (28:72, об. %). Колонка: Discovery C18 30*3 мм 5 мкм.

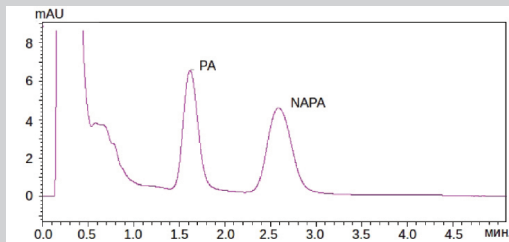


РИС. 2. Хроматограмма мочи с добавкой стандартного раствора прокаинамида (РА) и ацетилпрокаинамида (НАРА) (5 мкг/мл), ПФ ацетонитрил – 0,005М C₁₂H₂₅NaSO₄, 0,005М NaH₂PO₄, pH 3,0 (28:72, об. %). Колонка Discovery C18 30*3 мм 5 мкм.

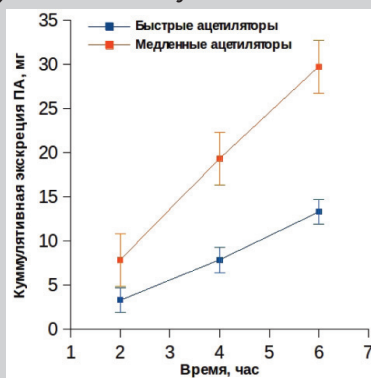


РИС. 3. Фармакокинетические кривые кумулятивной экскреции прокаинамида с мочой после перорального однократного приема в дозе 0,25 г: быстрый фенотип (n=10); медленный фенотип ацетилирования (n=10).

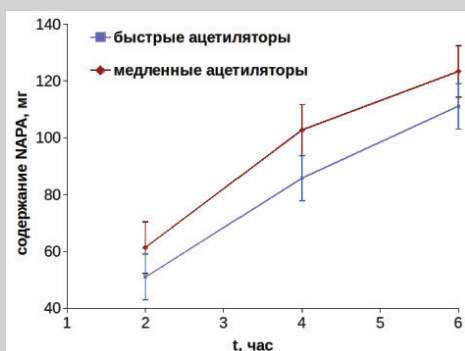


РИС. 4. Фармакокинетические кривые кумулятивной экскреции N-ацетилпрокаинамида (НАРА) с мочой после перорального однократного приема прокаинамида в дозе 0,25 г: быстрый фенотип (n=10); медленный фенотип ацетилирования (n=10).

Материал и методы

Исследования проводились на хроматографе с диодно-матричным детектором Shimadzu LC-20 и программным обеспечением LabSolutions. Хроматографический анализ проводился при объеме вводимой пробы 10 мкл, температуре термостата колонки 40°C, составе подвижной фазы: 0,005М C₁₂H₂₅NaSO₄, 0,005М NaH₂PO₄, pH 3,0, ацетонитрил = 72:28, скорости потока 1,5 мл/мин, на неподвижной фазе Discovery C18 30*3 мм 5 мкм с детектированием при 282 нм. В работе также использованы аналитические весы MettlerToledo XP205; пипеточный дозатор одноканальный с переменным объемом Sartorius Biohit; центрифуга Sigma 2-16PK; встряхиватель IKA KS 260 basic; система водоподготовки Millipore, Milli-Q Advantage A10 (Франция).

При разработке методики количественного определения прокаинамида использовали его стандартный образец (USP). Реактивы: натрия додецилсульфат, натрия дигидрофосфат, ацетонитрил PAI-ACS, ортофосфорная кислота 85% производства фирмы Panreac.

Проведен синтез ацетильного метаболита прокаинамида. Для выделения прокаинамида-основания из его гидрохлорида к его 25 мл 10% водного раствора добавляли по каплям 5% раствор КОН до pH 9–10 по универсальной индикаторной бумаге [6]. К полученному раствору добавляли 25 мл хлороформа и встряхивали в течение 10 мин. Органический слой отделяли, сушили над сульфатом магния. Хлороформ удаляли в вакууме водоструйного насоса.

Был получен прокаинамид-основание в виде густого масла. Спектр ЯМР¹H (CDCl₃, δ, м.д.): 1,05т (6H, CH₃, ³J 7,1 Гц); 2,57к (4H, CH₂, ³J 7,1 Гц); 2,64т (2H, CH₂N, ³J 6,0 Гц); 3,44–3,45м (2H, CH₂NH); 4,02 уш. с. (2H, NH₂); 6,65д (2H, ArH, ³J 8,6 Гц); 6,81 уш. с. (1H, NH); 7,62д (2H, ArH, ³J 8,6 Гц).

Полученное масло прокаинамида растворяли в 20 мл хлороформа. Раствор охлаждали до 5°C. К раствору при комнатной температуре прикапывали при перемешивании избыток (2 мл) свежеперегнанного ацетилхлорида. Через 20 мин после перемешивания стал выпадать белый осадок. Через 1 ч 30 мин осадок отфильтровали, промыли хлороформом и перекристаллизовали из изопропилового спирта. Выход очищенного ацетилпрокаинамида составил 1,1 г (44%). Температура плавления после сушки 189–190°C [6]. Спектр ЯМР¹H (CD₃OD, δ, м.д.): 1,38т (6H, CH₃, ³J 7,3 Гц); 2,17с [3H, CH₃C(O)]; 3,35–3,39м [4H, CH₂CH₂]; 3,41т [2H, CH₂NH, ³J 6,1 Гц]; 3,77т (2H, CH₂N, ³J 6,1 Гц); 7,71д (2H, ArH, ³J 8,7 Гц); 7,87д (2H, ArH, ³J 8,7 Гц).

В качестве здоровых добровольцев привлекались лица обоего пола в возрасте от 18 до 45 лет, отвечающие следующим критериям: верифицированный диагноз «здоров» по данным стандартных клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования; информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения добровольцев из исследований: отягощенный аллергологический анамнез; лекарственная непереносимость; хронические заболевания сердечно-сосудистой, бронхолегочной, нейроэндокринной систем, а также заболевания желудочно-кишечного тракта, печени, почек, крови; острые инфекционные заболевания менее чем за четыре недели до начала исследования; регулярный прием лекарственных препаратов менее чем за две недели

до начала исследования; прием лекарственных препаратов, оказывающих выраженное влияние на гемодинамику, функцию печени; прием алкоголя во время и до исследования за пять дней; прием кофеина во время и до исследования за пять дней.

Для определения фенотипа ацетилирования использовался прокаинамид в лекарственной форме в виде таблеток в дозе 0,25 г (Ферейн, Москва), которая однократно перорально принималась с 200 мл воды. Перед приёмом тест-препарата у каждого испытуемого получали образцы мочи, не содержащей прокаинамид. Мочу собирали каждые два часа в течение шести часов после приёма тест-препарата. В качестве тест-препарата сравнения для оценки фенотипа ацетилирования обследуемых был использован изониазид в дозе 0,45 г при его спектрофотометрическом определении в моче в виде окрашенных производных с метаванадатом аммония [7].

Результаты и их обсуждение

Для поиска оптимальной аналитической длины волны использовались данные по светопоглощению анализируемых веществ, полученные с помощью диодно-матричного детектора непосредственно в условиях разделения в хроматографической системе. При этом при 282 нм достигается оптимальное для детектирования поглощение прокаинамида и его ацетильного метаболита.

В процессе исследования выполнена оптимизация прободготовки и хроматографических условий разделения. Как показали проведенные эксперименты, для полного осаждения белков к 1 мл мочи достаточно добавить 1 мл ацетонитрила при встряхивании в течение 15 минут. После этого образцы центрифугируют при 14000 об./мин в течение 4 минут. Надосадочную жидкость используют для анализа.

Приемлемую для количественных определений степень разделения анализируемых веществ удалось получить на колонке Discovery C18 с использованием ион-парного реагента додецилсульфата натрия и подвижной фазы (ПФ) состава 0,005M NaH₂PO₄, – ацетонитрил при соотношении ацетонитрила и 0,005M C₁₂H₂₅NaSO₄, 0,005M NaH₂PO₄, pH 3,0 (28:72, об. %). Проводили анализ образцов чистой мочи, а также образцов мочи с добавлением стандартного раствора прокаинамида (рис. 1, 2). На хроматограммах чистых образцов не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания прокаинамида и N-ацетилпрокаинамида.

При этом хорошо воспроизводимые зависимости площадей пиков от концентрации анализируемых веществ линейны для области концентраций 5–500 мкг/мл: площадь пика = $1,10 \times 10^4 \times [\text{концентрация прокаинамида, мкг/мл}] + 0,93$; $R^2=0,998$; $n=10$ и площадь пика = $8,01 \times 10^5 \times [\text{концентрация N-ацетилпрокаинамида, мкг/мл}] + 0,48$; $R^2=0,997$; $n=10$.

Правильность определения прокаинамида и N-ацетилпрокаинамида в моче была оценена методом введено – найдено. Полученные данные свидетельствовали, что при выбранных условиях компоненты мочи не оказывают мешающего влияния на определения аналитов.

С помощью разработанной методики хроматографического определения прокаинамида и N-ацетилпрокаинамида в моче была проведена оценка их количества при выведе-

нии с мочой из организма человека. Предварительно у всех испытуемых была проведена оценка активности процессов ацетилирования при использовании изониазида в качестве тест-препарата по ранее опубликованной методике [7], по результатам экскреции которого с мочой было установлено распределение на группы быстрых (фракция дозы изониазида $3,25 \pm 0,25\%$, 14 чел.) и медленных (фракция дозы изониазида $9,60 \pm 1,48\%$, 16 чел.) ацетилаторов. В последующем в этих же группах при приеме прокаинамида за 6 часов исследования было зафиксировано выведение $11,9 \pm 1,2\%$ свободного прокаинамида у людей с медленным фенотипом ацетилирования, а у лиц с быстрым фенотипом ацетилирования $5,12 \pm 0,66\%$ соответственно. Кинетические кривые экскреции лекарственного вещества с мочой приведены на рис. 3. В случае оценки количества N-ацетилпрокаинамида в моче (рис. 4) видно, что содержание этого метаболита в пробах мочи достоверно не различается в группах быстрых и медленных ацетилаторов. Это не позволяет судить о фенотипе ацетилирования обследуемых по уровню содержания метаболита N-ацетилпрокаинамида при его экскреции с мочой при пероральном приеме прокаинамида.

Выводы

1. Установлены условия одновременного хроматографического определения прокаинамида и его ацетильного метаболита в моче на нормально-фазном сорбенте Discovery C18 30*3 мм 5 мкм. Оптимальные результаты определений достигаются при использовании подвижной фазы состава ацетонитрил 0,005M NaH₂PO₄, pH 3,0 в присутствии ион-парного реагента 0,005M додецилсульфата натрия и диодно-матричного детектирования при аналитической длине волны 282 нм.

2. Оценка количества выводимого с мочой прокаинамида в процентах от вводимой дозы (фракции дозы) позволяет судить о фенотипе ацетилирования обследуемых. При этом уровень выводимого неизменным прокаинамида для быстрых и медленных ацетилаторов различается более чем в два раза. Однако, содержание N-ацетилпрокаинамида в пробах мочи при кумулятивной экскреции за 6 часов достоверно не различается в группах быстрых и медленных ацетилаторов.

3. Разработанную методику в дальнейшем можно использовать в клинической практике персонализированной медицины для определения фенотипа ацетилирования пациентов при использовании прокаинамида в качестве тест-препарата процессов ацетилирования при его экскреции с мочой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кукес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины. GEOTAP-Медиа, Москва. 2008.

Kukes V.G., Grachev S.V., Sichev D.A., Ramenskaya G.V. Metabolizm lekarstvennix sredstv. Nauchnie osnovy personalizirovannoi medicini. GEOTAP-Media, Moskva. 2008.

2. Гармонов С.Ю., Евгеньев М.И., Зыкова И.Е. Аналитические методы исследования генетического полиморфизма организма человека. Проблемы аналитической химии. Химический анализ в медицинской диагностике. 2010. Т. 11. С. 21-65.

Garmonov S.Yu., Evgenev M.I., Zikova I.E. *Analiticheskie metodi issledovaniya geneticheskogo polimorfizma organizma cheloveka. Problemi analiticheskoi khimii. Khimicheskii analiz v medicinskoj diagnostike. 2010. T. 11. S. 21-65.*

3. Справочник РЛС: лекарственные средства и препараты. Инструкция, применение, описание [Электронный ресурс]. Электрон. дан. 2011. Режим доступа: <http://www.rlsnet.ru>

Spravochnik RLS: lekarstvennye sredstva i preparaty. Instruktsiya, primeneniye, opisaniye [Elektronnyy resurs]. Elektron. dan. 2011. Rezhim dostupa: <http://www.rlsnet.ru>

4. Al-Tamrah S., Al-Abbad S. Spectrophotometric determination of procainamide hydrochloride using sodium periodate. *Arabian Journal of Chemistry. 2015. № 8. P. 609-613.*

5. Lessard E., Fortin A., Coquet A., Belanger P., Hamelin B., Turgeo J. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of procainamide and its N-acetylated metabolite in plasma: application to a single-dose

pharmacokinetic study. *Journal of Chromatographic Science. 1998. Vol. 36. P. 49-54.*

6. Sim E., Stanley L., Gill E. W., Jones A. Metabolites of procainamide and practolol inhibit complement components C3 and C4. *Biochem. J. 1988. Vol. 251. P. 323-326.*

7. Гармонов С.Ю., Шитова Н.С., Яковлева А.В., Юсупов Р.А. Метод косвенного определения активности N-ацетилтрансферазы при использовании в качестве реагента метаванадата аммония для оценки экскреции изониазида с мочой человека. *Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 8. С. 49-53.*

Garmonov S.Yu., Shitova N.S., Yakovleva A.V., Yusupov R.A. Metod kosvennogo opredeleniya aktivnosti N-asetiltransferazi pri ispolzovanii c kachestve reagenta metavanadata ammoniya dlya osenki ekskresii izoniazida s mochoi cheloveka. Khimiko-farmaceuticheskii jurnal. 2008. T. 42. № 8. S. 49-53.



УДК: 615.014.2:615.282.03

Код специальности ВАК: 14.04.00, 14.03.10, 14.03.07

АНАЛИЗ ВИДОВОГО СОСТАВА И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ CANDIDA SPP. К СОВРЕМЕННЫМ АНТИМИКОТИКАМ

В.В. Новикова¹, С.Г. Езов², А.И. Селиванова²,

¹ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия»,

²ООО «Лабораторные технологии», г. Пермь

Новикова Валентина Васильевна – e-mail: vvnperm@yandex.ru

Проанализированы основные тенденции в этиологической структуре инфекций, вызванных *Candida spp.* Оценено распределение видового состава выделенных штаммов представителей рода *Candida*. Подтверждено лидирующее положение представителей *C. albicans* в этиологии кандидозной инфекции, в том числе в структуре кандидозного поражения половых путей. Выявлена высокая резистентность изученных штаммов *Candida spp.* к азоловым антимикотикам. Установлено, что данные определения чувствительности клинических изолятов диско-диффузионным методом требуют сопоставления с референтными методиками.

Ключевые слова: *Candida spp.*, этиология, резистентность, антимикотики.

The main trends in the etiological structure of the infections caused by *Candida spp.* has been evaluated. The distribution of species composition of selected strains of the genus *Candida* has been estimated. The leading position of the representatives of *C. albicans* in the etiology of *Candida* infection, including in the structure of candidal lesions of the genital tract has been confirmed. The high resistance of the studied strains of *Candida spp.* to azolouye antifungals was detected. It was established that the data determine the sensitivity of clinical isolates, disk diffusion method require comparison with reference methods.

Key words: *Candida spp.*, etiology, resistance, antifungals.

Введение

Проблема резистентности микроорганизмов в настоящее время приобретает глобальный характер и касается любой категории микроорганизмов. Устойчивость грибов к антимикотикам имеет стабильную тенденцию к прогрессированию [1, 2]. Селекция резистентных штаммов грибов происходит вследствие необоснованного применения противогрибковых средств, длительного использования отдельных препаратов в схеме лечения микотической инфекции. Инфекции, вызванные резистентными штаммами, отличаются длительным течением со склонностью к хронизации и возникновению рецидивов, что приводит к дополнительным материальным затратам на медикаментозное лечение и снижению качества жизни пациентов, нарушению их психоэмоционального состояния.

Цель исследования: изучить этиологическую структуру инфекций, вызываемых представителями *Candida spp.*, проанализировать показатели чувствительности выделен-

ных штаммов к наиболее часто используемым антимикотикам.

Материал и методы

Исследованы биосубстраты от 493 пациентов многопрофильных клиник (поликлиники и стационары) г. Перми. Культуральной диагностике подверглось отделяемое половых органов, конъюнктивы, уха, мокрота, моча, кал, мазки из зева и носа, раневое отделяемое. Положительные высевы зафиксированы в 181 случае. Для оценки чувствительности выделенных штаммов грибов использовался диско-диффузионный метод, являющийся унифицированным, доступным и легко воспроизводимым методом, при этом описана хорошая корреляция с референтными методиками (методом разведений) [3, 4]. Посевы осуществлялись на агар Сабуро. Использовались диски производства компании ЗАО «НИЦФ» ДИ-ПЛС-50-01, содержащие 80 ЕД нистатина, 10 мкг клотримазола, 20 мкг кетоконазола и 40 мкг флуконазола. Инокулированные