

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НОВОКАИНАМИДА В СЛЮНЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФЕНОТИПА АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

© Гармонов С.Ю.¹, Нугбиеню Л.К.¹, Салахов И.А.¹, Киселева Т.А.², Бухаров С.В.³

¹ Кафедра аналитической химии, сертификации и менеджмента качества

Казанского национального исследовательского технологического университета, Казань;

² кафедра эндокринологии Казанского государственного медицинского университета, Казань;

³ кафедра технологии основного органического и нефтехимического синтеза

Казанского национального исследовательского технологического университета, Казань

E-mail: serggar@mail.ru

Разработана методика количественного определения новокаинамида и его ацетильного метаболита в слюне методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием. Установлены условия хроматографического разделения при использовании изократического режима элюирования на колонке Discovery C18 с использованием ион-парного реагента додецилсульфата натрия и подвижной фазы состава ацетонитрил – 0,005 М $C_{12}H_{25}NaSO_4$, 0,005 М NaH_2PO_4 , pH 3,0. (28:72 об. %). Интервал определяемых содержаний новокаинамида и его ацетильного метаболита в слюне составляет 0,2 – 10 мкг/мл. Проведена валидация разработанной методики по показателям пригодности хроматографической системы, селективности, правильности, линейности и воспроизводимости. Показана возможность использования методики для оценки индивидуальных фенотипов метаболизма процессов ацетилирования новокаинамида у человека путем оценки уровня содержаний новокаинамида в слюне в течение 6 часов после приема в дозе 0,25 г, которые достоверно различаются для быстрых и медленных ацетиляторов.

Ключевые слова: новокаинамид, слюна, высокоэффективная жидкостная хроматография, фенотипы ацетилирования.

METHOD DEVELOPMENT FOR THE CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF NOVOCAINAMIDE IN SALIVA FOR ACETYLATOR PHENOTYPE EVALUATION IN HUMANS

Garmonov S.Yu.¹, Nugbienyo L.K.¹, Salakhov I.A.¹, Kiseleva T.A.², Bukharov S.V.³

¹ Department of Analytical Chemistry, Certification and Quality Management of Kazan National Research Technological University, Kazan;

² Department of Endocrinology of Kazan State Medical University, Kazan;

³ Department of Basic Organic and Petrochemical Synthesis Technology of Kazan National Research Technological University, Kazan

A method, involving high-performance liquid chromatography with diode-array detection, was developed for the quantitative determination of novocainamide and its metabolite (N-acetylnovocainamide) in saliva. Chromatographic condition of isocratic elution was established with Discovery C18 column, using mobile phase consisting of acetonitrile and 5 mM phosphate buffer, pH 3.0 (28:72 vol.%), containing ion-pair reagent, 5 mM SDS. The interval of determination of novocainamide and its metabolite, N-acetylnovocainamide in saliva was 0.2 – 10 µg/ mL. Validation of the developed method was carried out on indicators of suitability of chromatographic system, selectivity, accuracy, linearity and reproducibility. The possibility of the application of the developed method was demonstrated for the assessment of individual metabolic phenotypes of acetylation of novocainamide in humans by evaluating the level of novocainamide content in saliva within 6 hours after administering a dose of 250 mg. The concentrations of novocainamide determined in saliva reliably differ for fast and slow acetylators.

Keywords: Novocainamide, saliva, high-performance liquid chromatography, acetylators phenotypes.

Одним из путей метаболизма лекарственных средств (ЛС) являются генетически детерминированные процессы ацетилирования при участии фермента N-ацетилтрансферазы печени [1, 4]. Путем N-ацетилирования происходит биотрансформация ЛС, содержащих аминные функциональные группы, и у человека при этом сформированы фенотипы быстрого и медленного метаболизма. Оценка фенотипов ацетилирования имеет важное значение при внедрении в клиническую практику подходов персонализированной медицины для оптимизации дозировки ЛС и

учета генетических факторов при проведении фармакотерапии различных заболеваний [1, 3].

Новокаинамид представляет собой антиаритмический препарат, оказывающий мембраностабилизирующее действие, который снижает возбудимость миокарда предсердий и желудочков. Метаболизируется в печени с образованием активного метаболита - N-ацетилновокаинамида, обладающего выраженной активностью антиаритмических лекарственных средств. Около 25% введенного ЛС превращается в метаболит, однако при быстром ацетилировании или хронической почечной недостаточности превращению подвер-

гается 40% дозы. При хронической почечной и сердечной недостаточности метаболит быстро накапливается в крови до токсических концентраций, при этом концентрация новокаинамида остается в допустимых пределах [4, 8].

Для количественного определения новокаинамида и его метаболита в различных биологических матрицах описаны спектрофотометрические [5] и хроматографические методы [2, 4, 7]. Однако в настоящее время в литературе не представлены способы оценки интенсивности процессов ацетилирования новокаинамида по его содержанию в слюне пациентов.

В связи с этим цель работы состояла в разработке методики определения содержания новокаинамида в слюне человека при использовании обращено-фазной ВЭЖХ и изучении возможности ее применения для оценки фенотипа ацетилирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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: 0,005 М $C_{12}H_{25}NaSO_4$, 0,005М NaH_2PO_4 , pH 3,0 : ацетонитрил = 72 : 28, скорости потока: 1,5 мл/мин, на неподвижной фазе Discovery C18 30*3 mm 5 μ m 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 новокаинамида использовали его стандартный образец (USP). Реактивы: натрия додецилсульфат, натрия дигидрофосфат, ацетонитрил PAI-ACS, ортофосфорная кислота 85% производства фирмы Panreac. Синтез ацетильного метаболита новокаинамида проведен по методике E. Sim et al. [9].

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 системы, а также заболевания желудочно-кишечного тракта, печени, почек, крови; острые инфекционные заболевания менее чем за 4 недели до начала исследования; регулярный прием лекарственных препаратов менее чем за 2 недели до начала исследования; прием лекарственных препаратов, оказывающих выраженное влияние на гемодинамику, функцию печени; прием алкоголя во время и менее чем за 5 дней до исследования; прием кофеина во время и менее чем за 5 дней до исследования.

Для определения фенотипа ацетилирования использовался новокаинамид в лекарственной форме в виде таблетки в дозе 0,25 г (Ферейн, Москва), которая однократно перорально принималась с 200 мл воды. Перед приемом тест-препарата у каждого испытуемого отбирали слюну, не содержащую новокаинамид. Слюну собирали каждые два часа в течение 6 часов после приема тест-препарата.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При выборе аналитических длин волн руководствовались максимальным светопоглощением анализируемых соединений при 282 нм в условиях разделения в хроматографической системе при использовании диодно-матричного детектора.

В процессе работы выполнена оптимизация пробоподготовки и хроматографических условий разделения. Как показали проведенные эксперименты, для полного осаждения белков к 1 мл слюны достаточно добавить 1 мл ацетонитрила при встряхивании в течении 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 0.005М NaH_2PO_4 – ацетонитрил. Соотношение компонентов ПФ выбиралось экспериментально. Было приготовлено несколько растворов с различным соотношением смеси ацетонитрила и буферного раствора. Испытав растворители, получили наилучший результат при соотношении ацетонитрила и 0,005 М $C_{12}H_{25}NaSO_4$, 0,005М NaH_2PO_4 , pH 3,0 (28:72, об. %). Проводили анализ

образцов чистой слюны, а также образцы чистой слюны с прибавлением стандартного раствора (рис. 1, 2). На хроматограммах чистых образцов не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания новокаинамида и N-ацетилновокаинамида.

Количественное определение проводилось методом внешнего стандарта. По полученным данным были построены калибровочные прямые зависимости площади пика в интервалах

определяемых содержаний от 0,2 – 10 мкг/мл (рис. 3, 4).

Правильность хроматографических определений новокаинамида и N-ацетилновокаинамида в слюне была оценена с использованием метода «введено-найдено» (табл. 1). Результаты этой оценки демонстрируют отсутствие мешающего влияния различных компонентов биологических жидкостей на результаты ВЭЖХ определений.

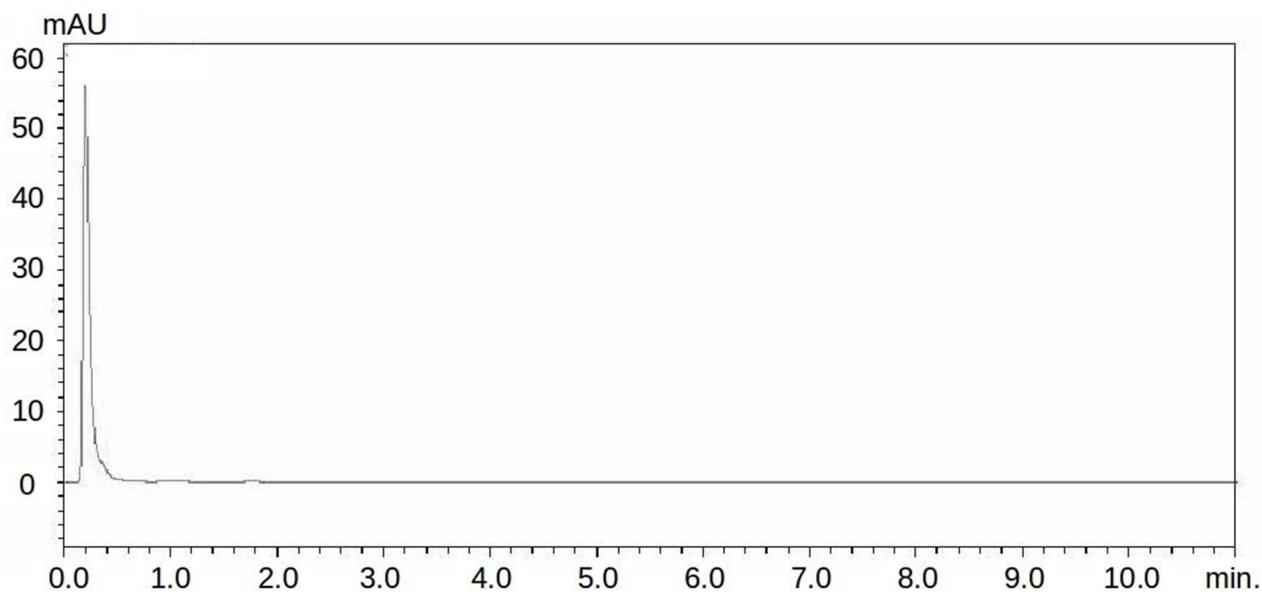


Рис. 1. Хроматограмма слюны человека до приема препарата в условиях ВЭЖХ анализа, ПФ ацетонитрил – 0,005 М $C_{12}H_{25}NaSO_4$, 0,005М NaH_2PO_4 , pH 3,0 (28:72, об. %). Колонка: Discovery C18 30*3 мм 5 мкм.

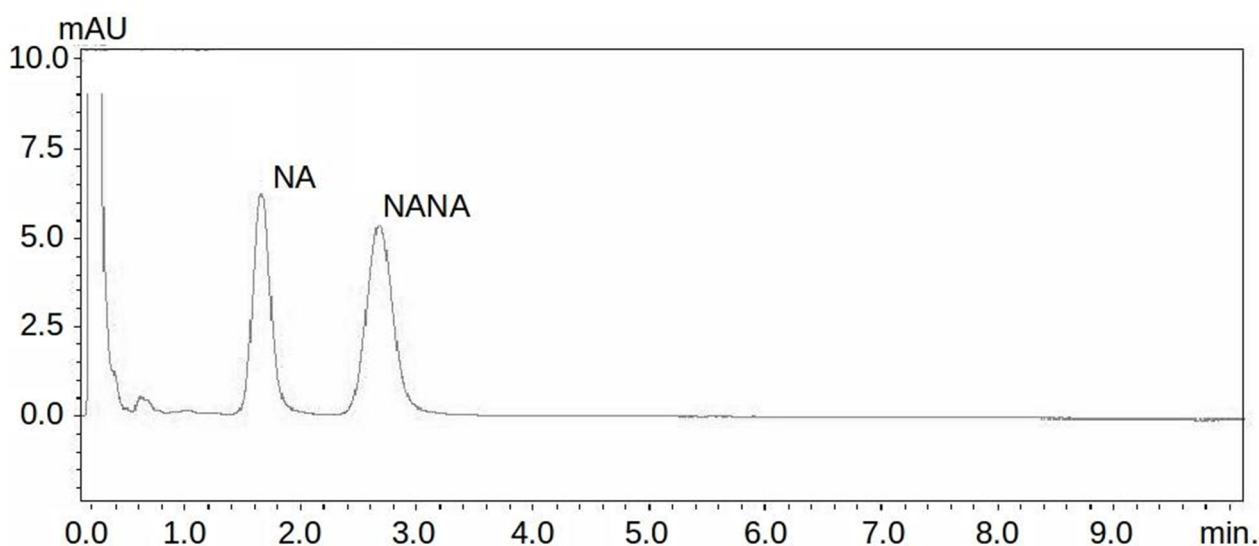


Рис. 2. Хроматограмма слюны с добавкой стандартного раствора новокаинамида (NA) и ацетилновокаинамида (NANA) (5 мкг/мл), ПФ ацетонитрил – 0,005 М $C_{12}H_{25}NaSO_4$, 0,005М NaH_2PO_4 , pH 3,0 (28:72, об. %). Колонка Discovery C18 30*3 мм 5 мкм.

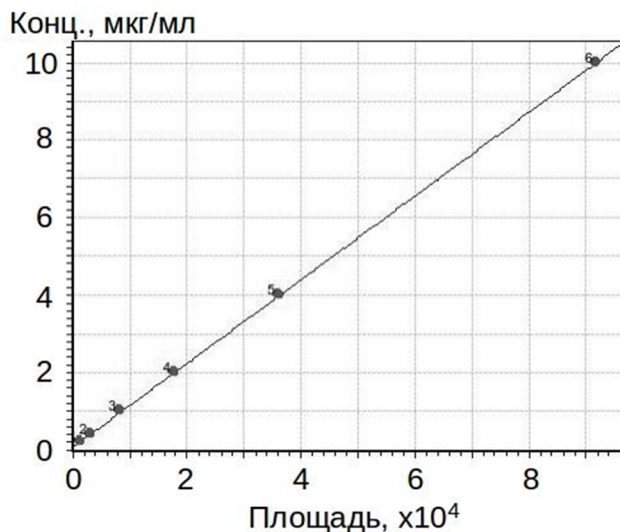


Рис. 3. Градуировочный график содержания новокаинамида в интервале определяемых содержаний от 0,2 до 10 мкг/мл.

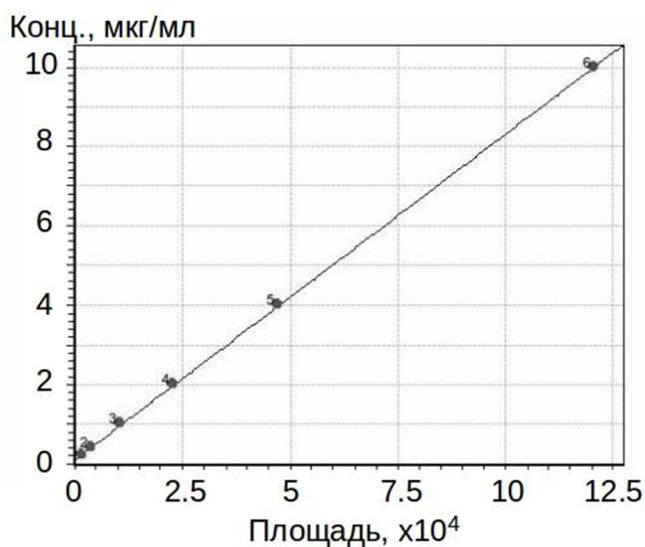


Рис. 4. Градуировочный график содержания N-ацетилновокаинамида в интервале определяемых содержаний от 0,2 до 10 мкг/мл.

Таблица 1

Результаты определения новокаинамида и N-ацетилновокаинамида в биологических жидкостях методом ВЭЖХ (n=6, p=0,95)

Аналит	Интервал определяемых содержаний	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	RSD
Новокаинамид	0,2-10 мкг/мл	0,20	0,22±0,02	0,09
		1,00	1,05±0,05	0,05
		5,00	5,05±0,08	0,02
N-ацетилновокаинамид	0,2-10 мкг/мл	0,20	0,22±0,02	0,08
		1,00	1,03±0,04	0,03
		5,00	5,05±0,06	0,01

Основные валидационные характеристики

Валидационная характеристика	Критерий приемлемости	Новокаионамид	N-ацетилновокаионамид
Пригодность хроматографической системы	Число теоретических тарелок (N): > 2000	3100	3120
	Коэффициент асимметрии пика: $< 2,5$	1,28	1,29
	Разрешение между пиками (R_s): $> 1,5$	3,1	3,1
Селективность	На хроматограмме чистой слюны должен отсутствовать пик со временем удерживания новокаионамида и N-ацетилновокаионамида	На хроматограмме чистой слюны не наблюдается пика со временем удерживания новокаионамида	На хроматограмме чистой слюны не наблюдается пика со временем удерживания N-ацетилновокаионамида
Линейность	R^2 не менее 0,999	0,9999	0,9999
Правильность	Метод «введено-найдено» $RSD \leq 10, \%$	5,2	3,8
Интервал определяемых содержаний	Индивидуально	0,2-10 мкг/мл	0,2-10 мкг/мл
Воспроизводимость	$RSD \leq 2, \%$	Метод внешнего стандарта 1,83	Метод внешнего стандарта 1,83

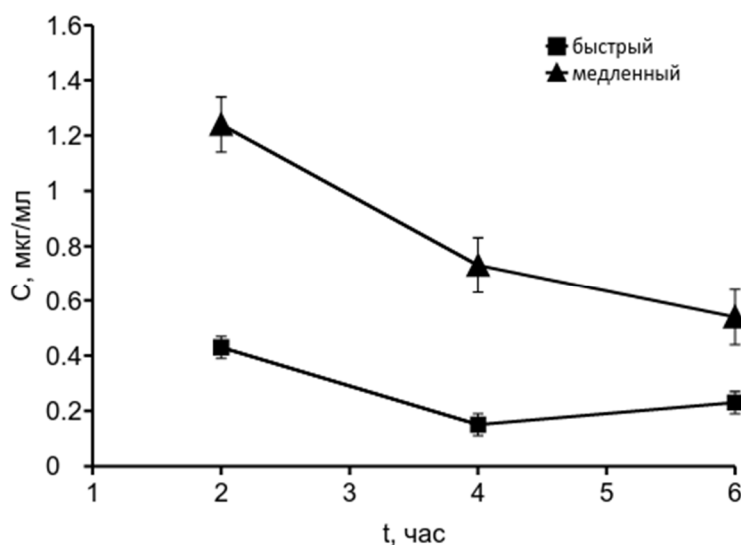


Рис. 5. Уровень содержания новокаионамида в слюне (мкг/мл) после перорального однократного приема в дозе 0,25 г: быстрый фенотип (n=10 чел.); медленный фенотип ацетилирования (n=10 чел.)

Достоверность результатов определения подтверждается параметрами пригодности хроматографической системы при определении новокаионамида и его ацетильного производного (табл. 2). С помощью разработанной методики обследованы здоровые добровольцы и оценено их распределение на медленный и быстрый фенотипы. По нашим данным соотношение ацетилирующих фенотипов у здоровых добровольцев составляет 50% медленных и 50% быстрых ацетилираторов, что

согласуется со сведениями из литературы [6, 8]. Полученные данные позволяют использовать в качестве критерия для фенотипирования ацетилирования по содержанию новокаионамида в слюне в течение 6 часов после приема. При этом уровень содержаний новокаионамида в слюне имеет достоверные различия в группах быстрых и медленных ацетилираторов в интервале от 2 до 6 часов после приема тест-препарата (рис. 5).

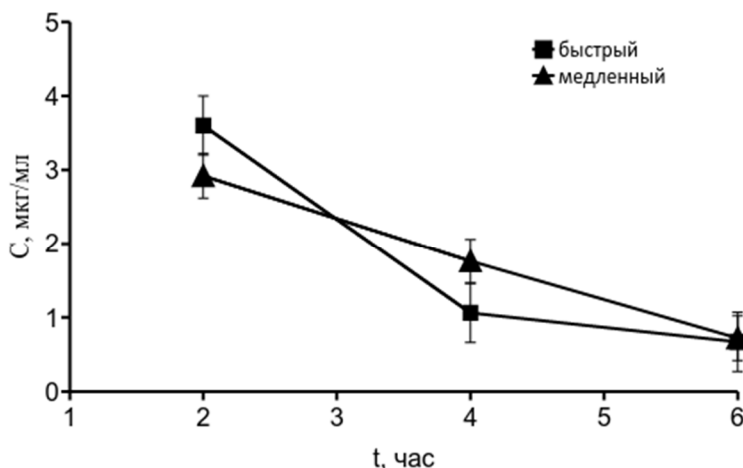


Рис. 6. Уровень содержания ацетилновокаинамида в слюне (мкг/мл) после перорального однократного приема новокаинамида в дозе 0,25 г: быстрый фенотип (n=10 чел); медленный фенотип ацетилирования (n=10 чел).

В случае оценки количества ацетилновокаинамида в слюне (рис. 6) видно, что содержание этого метаболита в пробах слюны достоверно не различается в группах быстрых и медленных ацетиляторов. Это не позволяет судить о фенотипе ацетилирования обследуемых по уровню содержания метаболита ацетилновокаинамида в слюне при пероральном приеме новокаинамида.

Разработанную методику неинвазивной оценки активности N-ацетилтрансферазы гепатоцитов печени человека в дальнейшем можно использовать для определения фенотипа ацетилирования пациентов с новокаинамидом в качестве тест-препарата при исследовании слюны, что делает этот способ более технически удобным и безопасным для обследуемых, а также доступным для рутинной клинической практики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кукес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В. Метаболизм лекарств. Научные основы персонализированной медицины. – М.: Геотар-Медиа, 2008. – 304 с.
2. Фармацевтический анализ / Под редакцией Г.К. Будникова и С.Ю. Гармонова. – М.: АГРАМАК-МЕДИА, 2013. – 778 с.
3. Химический анализ в медицинской диагностике: монография / Под ред. Г.К. Будникова – М.: Наука, 2010. – 504 с.
4. Холодов Л.Е., Яковлев В.П. Клиническая фармакокинетика. – М.: Медицина, 1985. – 464 с.
5. Al-Tamrah S., Al-Abbad S. Spectrophotometric determination of procainamide hydrochloride using sodium periodate // Arabian Journal of Chemistry. – 2015. – Vol. 8, N 5. – P. 609-613. – doi: 10.1016/j.arabjc.2012.02.004.
6. Grasela T.H., Sheiner L. Population pharmacokinetics of procainamide from routine clinical data // Clin. Pharmacokinet. – 1984. – Vol. 9, N 6. – P. 545-554.
7. Lessard É., Fortin A., Coquet A., Bélanger 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 // J. Chromatogr. Sci. – 1998. – Vol. 36, N 1. – P. 49-54.
8. Li F., Patterson A.D., Krausz K.W., Dick D., Frey F.J., Gonzalez F.J., Idle J.R. Metabolomics reveals the metabolic map of procainamide in humans and mice // Biochem. Pharmacol. – 2012. – Vol. 83, N 10. – P. 1435-1444. – doi: 10.1016/j.bcp.2012.02.013.
9. Sim E., Stanley L., Gill E., Jones A. Metabolites of procainamide and practolol inhibit complement components C3 and C4 // Biochem. J. – 1988. – Vol. 251, N 2. – P. 323-326.