

STANOVENÍ DEXTROMETHORFANU A JEHO METABOLITŮ V PLAZMĚ METODOU HPLC

GABRIELA ZIMOVÁ^a, JAROSLAV CHLÁDEK^b,
JIŘINA MARTÍNKOVÁ^b a MARTIN BERÁNEK^c

^aKatedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, e-mail: zimova@faf.cuni.cz, ^bÚstav farmakologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Šimkova 870, 500 01 Hradec Králové, ^cÚstav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice, 500 05 Hradec Králové

Došlo dne 21.I.2000

Klíčová slova: dextromethorfan, metabolity, plazma, HPLC, fenotyp

Úvod

Tato práce byla součástí studie, jejímž cílem bylo zjistit rozložení aktivity cytochromu P450 izoenzymu 2D6 (CYP2D6) v české populaci¹.

Aktivitu enzymu lze předpovědět buď určením genotypu (analýzou DNA), nebo určením fenotypu, tzn. podáním vhodné modelové látky, jejíž metabolismus závisí výlučně na aktivitě CYP2D6. Fenotyp se pak zjišťuje na základě množství podané modelové látky a jejího metabolitu (-ů) v plazmě nebo v moči¹.

Jako modelovou látku jsme použili dextromethorfan (DM), o němž je známo, že v organismu podléhá O-demethylaci na

dextrofan (DEX). Je prokázáno, že cestu O-demethylace katalyzuje hlavně CYP2D6. Vznik DEX z DM poskytuje spolehlivou informaci o aktivitě CYP2D6, v uspořádání *in vitro* a *in vivo*²⁻⁶. Poměr molárních koncentrací DM a DEX v moči, tzv. metabolický poměr (MP), je indexem pro hodnocení aktivity CYP2D6 *in vivo*. Jedinci s MP>0,3 jsou metabolizátoři pomalí, ostatní jsou metabolizátoři rychlí. Alternativní metabolickou cestou DM je jeho N-demethylace na methoxymorfinan (MM). Tato cesta je katalyzována několika dalšími izoenzymy cytochromu P450, a to CYP3A3/4, CYP3A5, CYP3A7, CYP2D9 a CYP2C19 (cit.^{3,4,7,8}). Cesta N-demethylace však nemůže nahradit defektní O-demethylaci. DEX i MM jsou dále demethylovány na hydroxymorfinan^{2,5,9} (HM). DEX a HM jsou v plazmě přítomny hlavně ve formě konjugátů s kyselinou glukuronovou. Struktury dextromethorfanu a jeho metabolitů jsou uvedeny na obr. 1.

V první části studie bylo provedeno stanovení MP v moči a na základě zjištěných výsledků byli dobrovolníci rozděleni na skupinu rychlých (93,1 %) a na skupinu pomalých (6,9 %) metabolizátorů¹. Tento výsledek se shoduje s výsledky obdobných studií, které byly provedeny v jiných evropských bílých populacích jak s dextromethorfanem, tak i s dalšími vhodnými modelovými látkami^{6,10-12}.

Ve druhé části studie byl stanovován MP v plazmě. Vzhledem k tomu, že je k dispozici jen velmi málo prací zabývajících se určováním fenotypu z plazmatických koncentrací modelových látek, zajímalo nás, jak výsledky získané analýzou moče budou korelovat s výsledky získanými analýzou plazmy^{1,13,14}. Závěry získané z fenotypování jsme porovnávali s genotypem zúčastněných dobrovolníků.

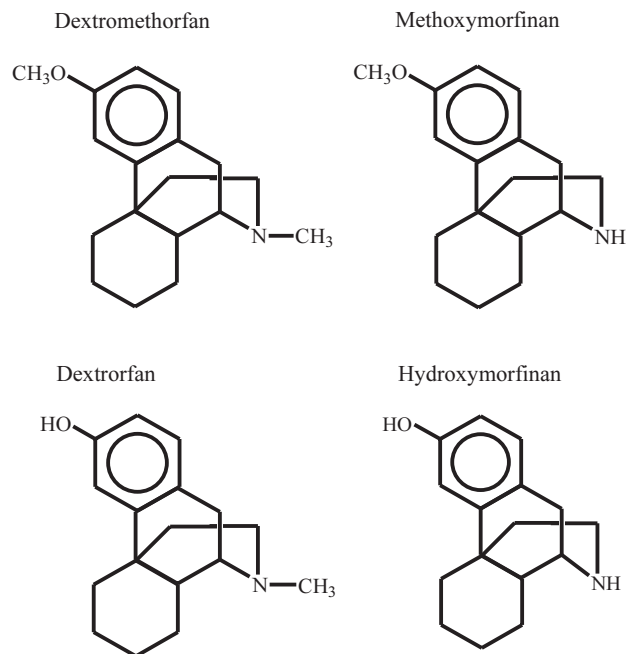
Experimentální část

Studie se účastnilo celkem 102 zdravých, nepříbuzných dobrovolníků ve věku 20–35 let (59 mužů, 43 žen). Jednorázově jim byl podán hydrobromid dextromethorfanu v dávce 27,5 mg per os (25 ml sirupu WICK Formula 44 Plus S, Wick Pharma, Gross-Gerau, SRN). 3 hodiny po podání látky byla 95 dobrovolníkům odebrána krev (10 ml) – 7 dobrovolníků odběr krve odmítlo. Přibližně 1,6 ml plné krve bylo odděleno a použito k určení genotypu. Genotyp byl určován metodou PCR (Polymerase Chain Reaction)^{14,15}. Do té doby byla krev uchovávána při –20 °C. Zbytek krve byl zcentrifugován (3000 ot.min⁻¹, 10 min) a získaná plazma byla uchovávána při –20 °C až do analýzy.

HPLC stanovení

Konfigurace přístroje: pumpa LC-10AS, dávkovací zařízení SIL-10A a fluorescenční detektor RF-10A (excitační a emisní vlnová délka 280 nm/315 nm) od firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko)

Chromatografické podmínky: kolona: Tessek phenyl, 150×3 mm, 5 μm (Tessek, Praha, ČR), předkolona: Tessek phenyl, 30×3 mm, 10 μm (Tessek, Praha, ČR), mobilní fáze: acetonitril–KH₂PO₄ pufr (0,01 mol.l⁻¹) v poměru 3 : 2 (v/v), pH pufru 3,6 (upraveno 0,1 mol.l⁻¹ H₃PO₄), triethylamin (350 μl.l⁻¹), průtoková rychlost 0,7 ml.min⁻¹ (160–170 MPa), teplota autosampleru 10 °C, teplota kolony 30 °C, vnitřní standard: betaxolol (betaxololi hydrochloridum, Lokren



Obr. 1. Struktury analyzovaných látek

20 mg tbl., Synthelabo, Francie), standardy stanovených látek: dextromethorfan hydrobromid monohydrát, (+)-3-methoxymorfinan hydrobromid, (+)-3-hydroxymorfinan hydrochlorid a vian dextrorfanu monohydrát od firmy Hoffmann-La Roche, Švýcarsko

Úprava vzorků plazmy před analýzou

Na základě výsledků analýzy moče byli dobrovolníci podle fenotypu rozděleni na rychlé a pomalé metabolizátory. V důsledku předpokládaných rozdílných plazmatických koncentrací stanovených látek u rychlých a pomalých metabolizátorů byla plazma zpracovávána v odlišném množství u obou skupin. Pro izolaci DM a jeho metabolitů ze vzorků plazmy byla použita metoda extrakce a reextrakce v systému kapalina–kapalina. Konjugáty DEX a HM s kyselinou glukuronovou byly před extrakcí hydrolyticky rozštěpeny enzymem β -glukuronidasou. Vzorky byly analyzovány bez hydrolyzy i po hydrolyze s β -glukuronidasou.

V případě rychlých metabolizátorů bylo k hydrolyze odebráno 0,3 ml plazmy a přidáno 0,14 ml vodného roztoku octanu sodného ($0,2 \text{ mol.l}^{-1}$) a 0,011 ml β -glukuronidasy ($1,620 \mu\text{katal.l}^{-1}$). Tato směs byla inkubována ve vodní lázni temperované na 37°C . Inkubační doba 18 h byla předem experimentálně ověřena jako dostatečná pro úplnou hydrolyzu glukuronidů.

U pomalých metabolizátorů bylo hydrolytické štěpení glukuronidů prováděno s dvojnásobným množstvím plazmy než u rychlých metabolizátorů z důvodu očekávaných nízkých koncentrací metabolitů v plazmě. Dvakrát byl zvýšen také objem vodného roztoku octanu sodného a β -glukuronidasy.

Extrakce a reextrakce vzorků plazmy po inkubaci s β -glukuronidasou

V případě rychlých metabolizátorů bylo k extrakci odebráno 0,4 ml inkubační směsi, v případě pomalých metabolizátorů bylo odebráno množství dvojnásobné, tzn. 0,8 ml inkubační směsi (důvod viz výše). Další postup byl u obou typů metabolizátorů shodný.

K odebranému množství inkubační směsi bylo přidáno 0,16 ml Na_2CO_3 ($0,5 \text{ mol.l}^{-1}$), 0,1 ml betaxololu jako vnitřního standardu (2 ng.l^{-1} , ředěno $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl) a 5 ml extrakčního činidla (hexan:*n*-butanol, 9:1, v/v). Po 15 minutovém protřepání a následné centrifugaci (2000 rpm, 15 minut) byly zkumavky se vzorky vloženy do chlazené hexanové lázně (-20°C). Po zmrznutí vodné fáze byla organická vrstva převedena do čisté konické zkumavky. Vodná fáze byla po rozmrazení extrahována ještě jednou stejným postupem. Organické fáze z obou extrakcí byly spojeny a použity k reextrakci.

Ke spojeným organickým fázím bylo přidáno 0,3 ml KHSO_4 ($0,01 \text{ mol.l}^{-1}$). Po 15 minutovém třepání následovala centrifugace (2200 rpm, 15 min), po které byla vodná vrstva opět vymrazena a organická fáze byla odstraněna. Vodná fáze byla po rozmrazení nastříkována na kolonu v objemu 30–50 μl .

Extrakce a reextrakce vzorků plazmy bez inkubace

K 1 ml plazmy bylo přidáno 0,4 ml Na_2CO_3 ($0,5 \text{ mol.l}^{-1}$), 0,1 ml betaxololu jako vnitřního standardu ($2,5 \text{ ng.l}^{-1}$, ředěno

$0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl) a 5 ml extrakčního činidla (hexan:*n*-butanol, 9:1, v/v).

Dále pokračovala extrakce i reextrakce stejným způsobem jako v případě vzorků plazmy, které byly s β -glukuronidasou inkubovány. Nástřikový objem vodné fáze po jejím rozmrazení byl 50 μl .

Kalibrace

Kalibrační řada a vzorky kontroly kvality byly připravovány ředěním zásobních roztoků standardů lidskou plazmou. Plazma byla získána od subjektů, kterým nebyl dextromethorfan podán a její čistota byla před použitím chromatograficky ověřena. Objemy zásobních roztoků standardů a přidávané lidské plazmy při přípravě kalibrační řady a vzorků kontroly kvality byly současně ověřovány vážením. Koncentrace zásobních roztoků: DM $197,7 \text{ mg.l}^{-1}$, MM $208,5 \text{ mg.l}^{-1}$, DEX $1870,5 \text{ mg.l}^{-1}$ a HM $966,7 \text{ mg.l}^{-1}$ (ředěno $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl). Rozsahy koncentrací jednotlivých látek v kalibrační řadě byly $1,09 \cdot 10^{-3}$ – $0,14 \text{ mg.l}^{-1}$ pro DM, $0,62 \cdot 10^{-3}$ – $0,080 \text{ mg.l}^{-1}$ pro MM, $0,58 \cdot 10^{-3}$ – $0,074 \text{ mg.l}^{-1}$ pro DEX a $0,59 \cdot 10^{-3}$ – $0,075 \text{ mg.l}^{-1}$ pro HM.

Parametry kalibračních závislostí byly získány ze závislosti poměrů ploch píků stanovené látky a vnitřního standardu na teoretické koncentraci analyzované látky metodou vážené lineární regrese (program SOLO, BMDP Statistical Software, Los Angeles, California).

Výsledky a diskuse

Použité chromatografické podmínky umožnily úplnou separaci a stanovení DM, jeho metabolitů a vnitřního standardu. Za těchto podmínek neinterferovaly endogenní látky s látkami analyzovanými. Chromatografické záznamy analýz jsou uvedeny na obr. 2 a 3. Na chromatogramech většiny rychlých metabolizátorů nejsou patrné píky methoxymorfinanu.

Ke stanovení koncentrací dextromethorfanu a jeho metabolitů jsme použili metodu HPLC s fluorescenční detekcí. Metoda vznikla úpravou podmínek, které byly vypracovány v první části studie pro stanovení těchto látek v moči¹.

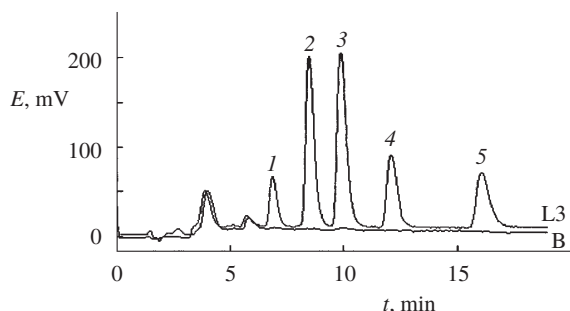
K izolaci DM a metabolitů z plazmy byl použit postup, který se osvědčil při extrakci těchto látek z moči¹. Byl upraven pouze objem extrakčního činidla, protože s jeho původním množstvím (4 ml) nebylo dosahováno dostatečné výtěžnosti. Při zvýšení objemu extrakční směsi na 5 ml stoupla výtěžnost DM, DEX, MM a BX o 10 až 14 %. Výtěžnost HM stoupla téměř o 20 %. Výsledné extrakční výtěžnosti jednotlivých analytů byly DM 91 %, DEX 101 %, HM 90 %, MM 76 % a BX 99 %.

Korelační koeficienty kalibračních závislostí během sedmi po sobě následujících dnů byly pro DM, DEX a MM vyšší než 0,998 a pro HM byly vyšší než 0,996. Relativní odchylky teoretických a skutečných koncentrací kalibračních bodů se pohybovaly v těchto mezích: pro DM od $-8,2\%$ do $9,9\%$, pro DEX od $-5,6\%$ do $7,9\%$, pro MM od $-8,3\%$ do $5,7\%$ a pro HM od $-8,9\%$ do $10,7\%$.

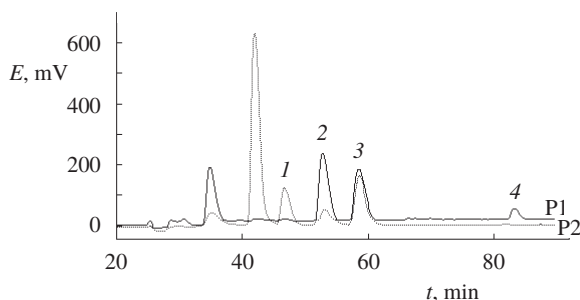
Přesnost a správnost analýz vzorků pro kontrolu kvality je vidět z údajů v tabulce I. Analýzy kalibračních bodů s nejnižšími koncentracemi byly opakovatelné a správné. Teoretické koncentrace těchto bodů (viz experimentální část) je možné

považovat za spodní meze stanovitelnosti pro všechny analyzované látky. Námí dosažená spodní mez stanovitelnosti je o jeden řád nižší než je uváděno v literatuře¹³. Je to pravděpodobně způsobeno dokonalejším izolačním postupem, který vedl téměř k úplnému odstranění endogenních látek. Pro hodnotu poměru signálu a šumu 5 byl detekční limit pro DM a jeho metabolity odhadnut na 0,073 ng. To odpovídá koncentraci $0,73 \cdot 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ analytů v plazmě.

Tabulka II uvádí koncentrace DM a jeho metabolitů v plazmě naměřené 3 hodiny po podání modelové látky a metabo-



Obr. 2. B – chromatogram slepého vzorku plazmy, L3 chromatogram kalibračního bodu L3: 1 – hydroxymorfinan, 2 – dextrorfan, 3 – betaxolol, 4 – methoxymorfinan, 5 – dextromethorfan



Obr. 3. P1 — chromatogram plazmy rychlého metabolizátora bez inkubace s β -glukuronidasou pro stanovení dextromethorfanu (4) a betaxololu (3); P2 chromatogram plazmy rychlého metabolizátora po inkubaci s β -glukuronidasou pro stanovení hydroxymorfinanu (1), dextrorfanu (2) a betaxololu (3)

Tabulka I

Výsledky analýz vzorků kontroly kvality

Vzorek	Analyt	Teoretická koncentrace [mg.l ⁻¹]	Poměr naměřené a teoretické koncentrace					Průměr	CV ^a [%]	RD ^b [%]
			1. den	2. den	3. den	4. den	5. den			
K1	DM	14,98	1,13	1,05	1,20	1,01	0,99	1,07	7,45	5,34
	DEX	27,71	0,99	1,07	0,99	0,99	0,96	1,00	3,66	2,13
	MM	16,03	1,01	1,03	1,00	0,94	0,85	0,98	6,80	1,75
K2	HM	7,35	1,10	1,12	1,21	1,23	1,04	1,14	6,06	3,13
	DM	3,37	1,09	1,19	1,31	1,00	1,11	1,14	9,11	7,51
	DEX	6,92	1,00	1,05	1,14	0,99	0,98	1,03	5,76	0,43
	MM	3,99	0,94	1,30	1,22	1,00	1,09	1,11	12,20	4,26
	HM	3,77	1,36	1,26	1,02	1,09	1,25	1,20	10,24	9,43

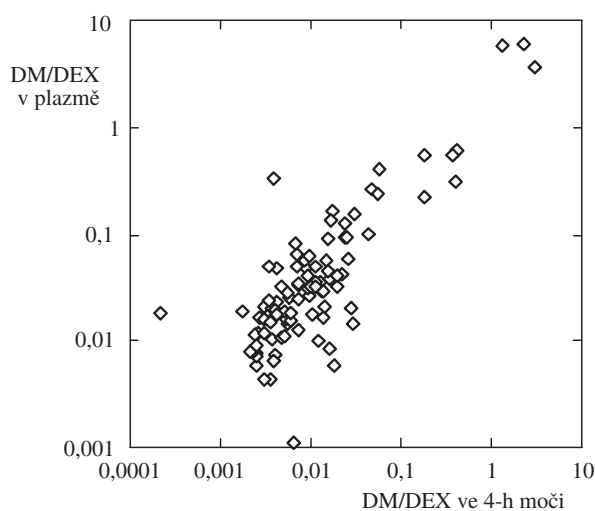
^a Variační koeficient, ^b relativní chyba

Tabulka II

Medián (rozpětí) koncentrací dextromethorfanu a jeho metabolitů v plazmě odebrané 3 h po podání 85 μmol (27,5 mg) hydrobromidu dextromethorfanu ve skupině rychlých (RM) a pomalých (PM) metabolizátorů a medián (rozpětí) metabolických poměrů (MP) počítaných jako poměr molárních koncentrací DM a DEX v plazmě

Látka	RM (N = 89)	PM (N = 6)
	Koncentrace [nmol.l ⁻¹]	
DM	7,98 (0,459–106)	58,3 (39,8–71,6)
DEX	316 (81,0–609)	42,8 (10,5–122)
MM ^a	<0,7 (<0,7–4,98)	1,18 (<0,7–3,26)
HM	178 (30,7–313)	24,3 (5,79–65,4)
MP (DM/DEX)	0,025 (0,001–0,56)	2,15 (0,32–6,15)

^a U 80 RM a 3 PM byla konc. <0,7 nmol.l⁻¹ (spodní limit stanovitelnosti)



Obr. 4. Korelace metabolických poměrů získaných měřením koncentrací dextromethorfanu (DM) a dextrorfanu (DEX) v moči (sbírané 0–4 h po podání modelové látky) a v plazmě (získané 3 h po podání modelové látky); $r_s = 0,705$, $p < 1 \cdot 10^{-4}$

lický poměr (DM/DEX) vypočtený z těchto koncentrací. Srovnáme-li výsledky uvedené v tabulce II s výsledky získanými analýzou moči (medián (rozpětí) MP v moči byl pro rychlé metabolizátory 0,007 (0,0001–0,18); a pro pomalé metabolizátory 1,3 (0,37–4,6)¹), vidíme, že hodnoty MP v plazmě se ve skupině rychlých a pomalých metabolizátorů překrývají. Z toho je možné usoudit, že hraniční hodnota MP zjištěná v plazmě bude odlišná od hodnoty 0,3, která je používána pro stanovení MP v moči. Velikost této hraniční meze v plazmě není zatím přesně známa. Literatura uvádí střední hodnotu MP v plazmě 0,126 (pro DM jako modelovou látku)¹³.

Korelace metabolických poměrů získaných jak měřením koncentrací látek v moči, tak měřením v plazmě vyplývá z obr. 4. Lze říci, že oba metabolické poměry spolu dobře korelují. Z toho vyplývá, že stanovení aktivity CYP2D6 s využitím metabolického poměru DM/DEX v plazmě získané 3 hodiny po podání modelové látky by mohlo být vhodnou alternativou ke standardnímu přístupu, tj. ke stanovení fenotypu CYP2D6 v moči. Tento přístup by byl zvláště vhodný v případech snížené funkce ledvin, kdy poměry látek v moči mohou být negativně ovlivněny změnami exkrece DM a DEX do moči.

LITERATURA

- Zimová G., Chládek J., Martínková J., Beránek M.: Chem. Listy 97, 132 (2000).
- Dayer P., Leemann T., Striberni R.: Clin. Pharmacol. Ther. 45, 34 (1989).
- von Moltke L. L., Greenblatt D. J., Grassi J. M., Granda B. W., Venkatakrishnan K., Schmider J., Harmatz J. S., Shader R. I.: J. Pharm. Pharmacol. 50, 997 (1998).
- Schmider J., Greenblatt D. J., Fogelman S. M., von Moltke L. L., Shader R. I.: Biopharm. Drug Dispos. 18, 227 (1997).
- Mortimer Ö., Lindström B., Laurell H., Bergman U., Rane A.: Br. J. Clin. Pharmacol. 27, 223 (1989).
- Droll K., Bruce-Mensah K., Otton S. V., Gaedigk A., Sellers E. M., Tyndale R. F.: Pharmacogenetics 8, 325 (1998).
- Gorski J. C., Jones D. R., Wrighton S. A., Hall S. D.: Biochem. Pharmacol. 48, 173 (1994).
- Jacqz-Aigrain E., Funck-Brentano C., Cresteil T.: Pharmacogenetics 3, 197 (1993).
- Ducharme J., Sami A., Irving W.W.: J. Chromatogr., B 678, 113 (1996).
- Alván G., Bechtel P., Izelius L., Gundert-Remy U.: Eur. J. Clin. Pharmacol. 39, 533 (1990).
- Bertilsson L.: Clin. Pharmacokinet. 29, 192 (1995).
- Henthorn T. K., Benitez J., Avram M. J., Martinez C., Llerena A., Cobaleda J., Krejcie T. C., Gibbon R. D.: Clin. Pharmacol. Ther. 45, 328 (1989).
- Köhler D., Härtter S., Fuchs K., Sieghart W., Hiemke Ch.: Pharmacogenetics 7, 453 (1997).
- Funck-Brentano Ch., Thomas G., Jacqz-Aigrain E., Poirie J. M., Simon T., Béréziat G., Jaillon P.: J. Pharm. Exp. Ther. 263, 780 (1992).
- Heim M., Meyer U. A.: Lancet 336, 529 (1990).

G. Zimová, J. Chládek, J. Martínková, and M. Beránek
(Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control,
Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové):
HPLC Determination of Dextromethorphan and Its Metabolites in Plasma

An HPLC method for the determination of dextromethorphan, dextrorphan, methoxymorphinan and hydroxymorphinan in plasma using fluorescence detection (excitation and emission wavelength 280 and 315 nm, respectively) was elaborated. The mobile phase was acetonitrile – 0.01 M-KH₂PO₄ (3:2) containing triethylamine (350 ml.l⁻¹), pH 3.6; flow rate 0.7 ml.min⁻¹; internal standard betaxolol. For isolation of the substances from plasma, liquid-liquid extraction and re-extraction with freezing out the aqueous phase was used. The recoveries of the substances were 91, 101, 76, 90 and 99 %, respectively. The method was used for determination of the CYP2D6 phenotype in 95 healthy, unrelated volunteers from Czech population.