

STANOVENÍ DEXTROMETHORPHANU A JEHO METABOLITŮ V MOČI METODOU HPLC

GABRIELA ZIMOVÁ^a, JAROSLAV CHLÁDEK^b,
JÍŘINA 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, Univerzita Karlova, Šimkova 870, 500 01 Hradec Králové, ^cÚstav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice, 500 05, Hradec Králové

Došlo dne 11.V.1999

Klíčová slova: dextromethorphan, metabolity, HPLC

Úvod

Jako polymorfismus neboli interindividuální variabilita je označován jev, kdy odezva na léčivo mezi jednotlivci je kvantitativně i kvalitativně odlišná. I když jsou tyto rozdíly patrné u všech chemických i biologických dějů, kterým léčivo po vstupu do organismu podléhá, nejvýraznější je variabilita biotransformace léčiv. Pro metabolismus léčiv je primárně rozhodující geneticky určená aktivita enzymů, tj. metabolický genotyp jednotlivce. Informace o metabolismu léčiv a funkčnosti jednotlivých metabolických drah mohou předem zabránit použití přípravků, které by byly pro daného jedince toxické nebo naprosto neúčinné¹.

Náš zájem se soustředil na enzymový systém cytochromu P450 (CYP450), který katalyzuje většinu reakcí první fáze biotransformace xenobiotik v lidském těle. Jeho izoformu 2D6 (CYP2D6) charakterizuje výrazný genetický polymorfismus, který je ve srovnání s ostatními CYP450 nejvíce prozkoumán. V literatuře bylo popsáno již více než 50 alel, které kódují CYP2D6 s různou aktivitou a vysvětlují tak přítomnost pomalých, intermediárních, rychlých a ultrarychlých metabolizátorů CYP2D6 v lidské populaci².

Rychlost, s jakou daný jedinec xenobiotika – substráty CYP2D6 – metabolizuje, lze předpovědět buď určením genotypu (analýzou DNA), nebo určením fenotypu, tj. podáním vhodné modelové látky, jejíž metabolismus závisí výlučně na aktivitě CYP2D6. Fenotyp je pak možné zjistit na základě množství podané modelové látky a jejího metabolitu (–ů) v krvi nebo v moči.

Pro zjišťování aktivity CYP2D6 v pokusech *in vivo* jsou nejčastěji jako modelové látky používány debrisochin, spartein a dextromethorphan (DM). Velice výhodný je DM, protože nevykazuje závažné vedlejší účinky. V řadě studií v uspořádání *in vitro* a *in vivo* bylo prokázáno, že O-demethylaci DM na dextrothorphan (DEX) (obr. 1) v lidském organismu katalyzuje téměř výlučně CYP2D6. Indexem, který spolehlivě odráží aktivitu CYP2D6, je tzv. metabolický poměr (MP). MP je poměr molárních koncentrací DM a DEX v moči:

$$MP = C_{DM} / C_{DEX}$$

Jedinci s MP > 0,3 jsou pomalí metabolizátoři, zatímco ostatní jsou metabolizátoři rychlí.

Alternativní cesta metabolismu DM na 3-methoxymorphinan (MM) je katalyzována některými dalšími izoenzymy (CYP450, viz obr. 1). Tato cesta se na metabolismu DM podílí asi z 10 %. DEX a MM dále podléhají demethylaci na hydroxymorphinan (HM). DM a MM jsou vylučovány do moči přímo, DEX a HM převážně jako glukuronidy.

Cílem studie bylo vypracovat HPLC metodu pro stanovení DM a metabolitů v moči a ověřit ji při stanovení fenotypu CYP2D6 ve vzorku zdravých subjektů populace České republiky.

Experimentální část

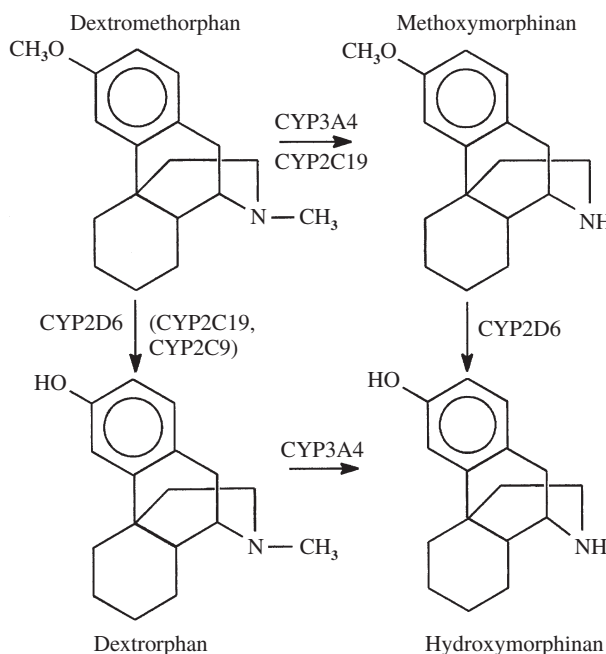
Studie se zúčastnilo 102 zdravých, nepřibuzných dobrovolníků ve věku 20–35 let (59 mužů, 43 žen). Jednorázově jim byl podán hydrobromid dextromethorphanu v dávce 27,5 mg per os (25 ml sirupu Wick Formula 44 Plus S, Wick Pharma, Gross-Gerau, SRN).

Dobrovolníci sbírali kvantitativně moč v intervalu 0–4 hodiny po podání látky. Objem moče byl stanoven vážením a odebrané vzorky (dvakrát 2 ml) byly uchovány při teplotě –80 °C až do analýzy (nejdéle 2 měsíce).

HPLC

Izolační postup sledovaných látek z moče a stanovení jejich koncentrací metodou HPLC s fluorescenční detekcí vznikl úpravou metod publikovaných v literatuře^{3–6}.

Konfigurace přístroje: Pumpa LC-10AS, dávkovací zařízení SIL-10A a fluorescenční detektor RF-10A (excitační a emisní vlnová délka 280 nm/310 nm) od firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko).



Obr. 1. Biotransformace dextromethorphanu v játrech

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), triethylamin (350 μl.l⁻¹), pH 3,6 (upraveno H₃PO₄, 0,1 mol.l⁻¹); průtoková rychlost mobilní fáze 0,7 ml.min⁻¹ (160–170 MPa); teplota kolony 30 °C, teplota autosampleru 10 °C; vnitřní standard: betaxolol (betaxololi hydrochloridum, Lokren 20 mg tbl., Synthelabo, Francie).

Standardy analyzovaných látek: dextromethorphan hydrobromid monohydrát, (+)-3-methoxymorphinan hydrobromid, (+)-3-hydroxymorphinan hydrochlorid a vínan dextroprhanu monohydrát od firmy Hoffmann-La Roche, Švýcarsko.

Úprava vzorků moče před analýzou

DM a jeho metabolity byly ze vzorků moče izolovány metodou extrakce a reextrakce v systému kapalina–kapalina. Konjugáty DEX a HM s kyselinou glukuronovou byly před extrakcí hydrolyticky rozštěpeny enzymem β-glukuronidasou. Při hydrolyze byl 1 ml moče s přidavkem 0,4 ml octanu sodného (0,2 mol.l⁻¹) a 0,031 ml (1,620 μkatal.l⁻¹) β-glukuronidasy inkubován ve vodní lázni temperované na 37 °C. Inkubační doba 18 h byla předem experimentálně ověřena jako dostatečná pro úplnou hydrolyzu glukuronidů.

Pro stanovení koncentrací DM a MM byly extrahovány vzorky neředěných inkubačních směsí a pro stanovení koncentrací HM a DEX byly použity vzorky inkubačních směsí ředěných slepou močí. Faktor ředění (10, 50 nebo 100) se u jednotlivých dobrovolníků lišil v závislosti na velikosti diurézy.

K 1 ml směsi ředěné i neředěné bylo přidáno 0,4 ml Na₂CO₃ (0,5 mol.l⁻¹), 0,1 ml vnitřního standardu (5 ng.l⁻¹, ředěno 0,1 mol.l⁻¹ HCl) a 4 ml extrakčního činidla (hexan: n-butanol, 9:1 v/v). Po 15 minutovém protřepání extrakční směsi následovala centrifugace (2200 rpm, 15 min). Potom byly zkumavky se vzorky vloženy do chlazené hexanové lázně (–20 °C). Po zmrznutí vodné fáze byla organická vrstva pře-

vedena do čisté konické zkumavky. Vodná fáze byla po rozmrazení extrahována ještě jednou stejným postupem. Organická fáze z obou extrakcí byly spojeny a použity k reextrakci. Ke spojeným organickým fázím bylo přidáno 0,3 ml KHSO₄ (0,01 mol.l⁻¹). Po 15 minutovém třepání následovala centrifugace (2200 rpm, 15 min). Potom byla vodná vrstva opět vymrazena a organická fáze byla odsáta. Vodná fáze byla po rozmrazení nastříkována na kolonu v objemu 3–50 μl.

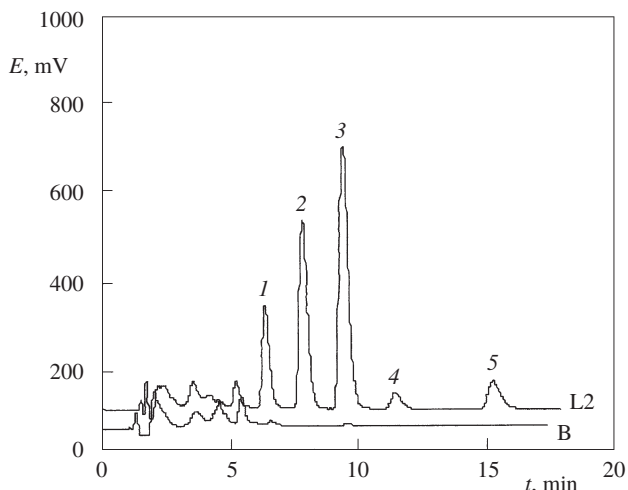
Kalibrační řada a vzorky kontroly kvality byly připravovány gravimetricky ředěním zásobních roztoků standardů slepou močí (konc. zásobních roztoků: DM 176,4 mg.l⁻¹, MM 143,0 mg.l⁻¹, DEX 1791,9 mg.l⁻¹ a HM 1073,0 mg.l⁻¹, ředěno 0,1 mol.l⁻¹ HCl). Rozsahy koncentrací jednotlivých látek v kalibrační řadě byly 4,87.10⁻³–0,159 mg.l⁻¹ pro DM, 5,16.10⁻³–0,167 mg.l⁻¹ pro MM, 0,0916–2,986 mg.l⁻¹ pro DEX a 0,0465–1,489 mg.l⁻¹ pro HM.

Parametry kalibračních závislostí byly získány ze závislosti poměru ploch pík stanovené látky a vnitřního standardu na teoretické koncentraci analyzované látky metodou vážené lineární regrese (součást programu NCSS 6. 0. 21, BMDP Statistical Software, Los Angeles, California).

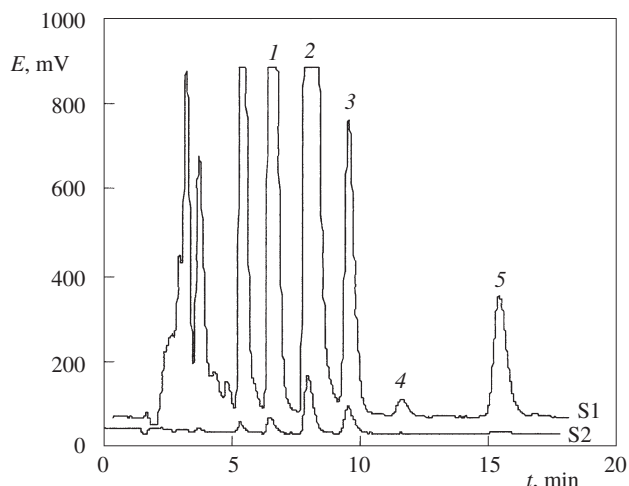
Výsledky a diskuse

Chromatografické záznamy analýz jsou uvedeny na obr. 2 a 3. Analýza jednoho vzorku trvala 17 minut. Zvolené chromatografické podmínky umožnily úplnou separaci a stanovení dextromethorphanu, jeho metabolitů a vnitřního standardu. Analýza močí získaných od 102 dobrovolníků před podáním dextromethorphanu prokázala, že endogenní látky neinterferují s látkami analyzovanými (obr. 2).

Extrakce DM a metabolitů z močí do organického rozpouštědla je problematická, protože HM a DEX jsou polárnější než MM a DM. Autoři dříve publikovaných extrakčních metod proto upřednostňovali použití opakované extrakce³, použití dvou extrakčních činidel⁴ nebo extrakci na pevných fázích⁵. Při extrakci směsí hexan–butanol je uváděna výtěžnost extrak-



Obr. 2 Chromatografický záznam analýz močí; B – chromatografický záznam slepé močí, L2 chromatografický záznam kalibračního bodu L2: 1 – hydroxymorphinan, 2 – dextroprhan, 3 – betaxolol, 4 – methoxymorphinan, 5 – dextromethorphan



Obr. 3 Chromatografické záznamy moče po inkubaci s β-glukuronidasou: S1 – neředěná inkubační směs pro stanovení dextromethorphanu (5) a methoxymorphinanu (4), S2 – ředěná inkubační směs pro stanovení hydroxymorphinanu (1), dextroprhanu (2) a betaxololu (3)

Tabulka I
Výsledky analýz vzorků kontroly kvality

Vzorek kontroly kvality	Analyt	Teoretická koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	Poměr naměřené a teor. konc. ve dnech							Průměr	CV ^a [%]	RE ^b [%]
			1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.			
K1	DM	0,153	0,92	1,02	1,00	0,99	0,96	0,98	0,97	0,98	3,4	-2,2
	DEX	3,15	0,93	1,05	1,04	0,99	0,93	0,97	1,08	1,00	5,8	-0,3
	MM	0,178	0,91	1,00	0,99	0,93	0,88	0,99	0,88	0,94	5,8	-5,8
	HM	1,61	0,95	1,07	1,03	1,03	0,92	0,96	1,06	1,00	5,7	0,3
K2	DM	0,0531	0,95	1,03	1,08	1,01	1,03	1,04	1,06	1,03	4,1	3,0
	DEX	1,10	0,94	1,03	1,08	0,95	0,98	1,01	1,05	1,01	5,1	1,0
	MM	0,0631	0,99	0,96	1,17	1,11	0,95	1,21	1,05	1,06	9,9	6,2
	HM	0,528	0,97	0,94	1,04	0,99	0,98	1,04	1,04	1,01	3,9	0,2

^a Variační koeficient, ^b relativní odchylka

Tabulka II
Metabolický poměr (MP) a exkrece dextromethorphanu a jeho metabolitů do moče v intervalu 0–4 h po podání 85 μmol (27,5 mg) hydrobromidu dextromethorphanu ve skupině rychlých (RM) a pomalých (PM) metabolizátorů

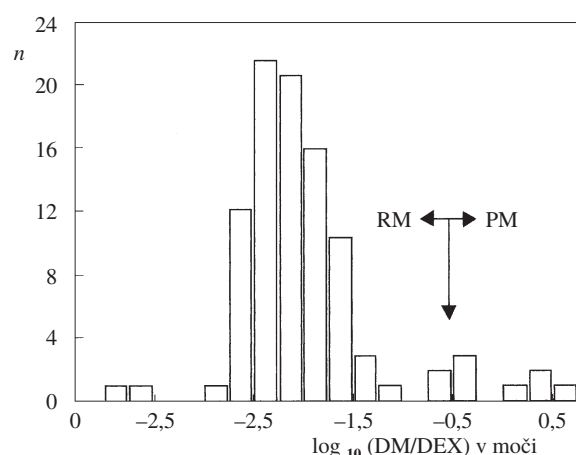
MP ^a	Medián (rozpětí)	
	RM (N = 95)	PM (N = 7)
	0,007 (0,0001–0,18)	1,3 (0,37–4,6)
DM	0,20 (0,005–2,2)	2,19 (0,96–13,5)
DEX	29,8 (3,70–50,8)	2,20 (0,46–8,85)
MM	0,02 (0,003–0,14)	0,13 (0,08–1,61)
HM	11,0 (0,94–19,3)	2,04 (0,09–4,53)

^a 4-h exkrece (% dávky); pro všechny látky statisticky významný rozdíl mezi RM a PM ($p < 0,0001$, Mann-Whitney U-test)

ce pro DM a DEX v rozmezí 50–80 % (cit.⁶). Opakovaná extrakce vzorků moči směsí hexan–butanol a vymrazování vodné fáze před oddělením organické fáze vedly v této studii k vyšší extrakční výtěžnosti u všech analytů (DM 97 %, DEX 99 %, HM 83 %, MM 92 % a BX 101 %).

Korelační koeficienty kalibračních závislostí získaných pro DM a metabolity během sedmi po sobě jdoucích dnů byly ve všech případech vyšší než 0,998. Průměrné relativní odchylky teoretických a analyzovaných koncentrací kalibračních bodů se pro všechny látky pohybovaly v rozmezí od -3,2 % do 3,6 %. Z toho vyplývá, že kalibrační závislosti byly v koncentračních rozmezích uvedených v experimentální části pro všechny látky lineární.

Variační koeficienty naměřených koncentrací mezi dny ($N = 7$) byly pro všechny kalibrační body a látky v rozmezí od 2,3 % do 7,4 %. Přesnost analýz v jednotlivých dnech byla odhadnuta z hodnot poměrů naměřené a teoretické koncentrace pro 5 vzorků kalibrační řady. Variační koeficienty těchto poměrů v jednotlivých dnech se pohybovaly v rozmezí 1,2 % až 6,9 % (DM, DEX a HM) a 2,6 % až 9,2 % (MM). Přesnost a správnost analýz vzorků kontroly kvality vyplývá z údajů v tabulce I. Výsledky analýz kalibračních bodů s nejnižšími



Obr. 4. Frekvenční histogram rozložení dekadických logaritmů hodnot metabolického poměru dextromethorphan (DM)/dextromethorphan (DEX) ve skupině 102 vyšetřených osob (počet dobrovolníků n)

koncentracemi byly reprodukovatelné a správné. Tyto teoretické koncentrace (uvedené v experimentální části) je možné považovat za spodní meze stanovitelnosti analyzovaných látek. Pro hodnotu poměru signálu a šumu 5 byl odpovídající detekční limit pro DM a metabolity odhadnut na 0,035 ng, což odpovídá koncentraci v moči 0,23 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. V porovnání s publikovanými detekčními limity HPLC metod s fluorescenční detekcí^{4,6} je námi dosažená hodnota o jeden řád nižší. Hlavním důvodem tohoto rozdílu je pravděpodobně to, že zvolené separační podmínky vedly k úplné absenci interferujících píků endogenních látek. Dalším důvodem je o 20–30 % vyšší výtěžnost námi použité extrakční metody.

Podle mezní hodnoty metabolického poměru DM/DEX v moči bylo 7 (6,9 %) dobrovolníků označeno jako pomalí metabolizátoři a 95 (93,1 %) dobrovolníků jako metabolizátoři rychlí. Tyto výsledky se shodují se závěry studií, které byly provedeny u jiných evropských bílých populací s dextromethorphanem, sparteinem a debrisochinem jako modelovými substráty⁷. V populaci České republiky byla provedena studie s methoprololem (substrát CYP2D6), která našla fenotyp pomalého metabolizátora u 6 z 97 účastníků⁸ (6,2 %). Frekvenční histogram rozložení dekadických logaritmů hodnot MP ve skupině 102 vyšetřovaných osob je uveden na obr. 4. Rozdíl v kumulativní exkrezi DM a metabolitů do moče za 4 h

od podání látky byl mezi RM a PM pro všechny látky statisticky vysoce významný (tabulka II). Přesto stanovení exkrece samotného DM (nevyžadující hydrolyzu glukuronidů) nemožňuje ve všech případech odlišit RM a PM, protože se rozmezí hodnot exkrece pro mateřskou látku mezi oběma skupinami překrývají.

LITERATURA

1. Mičuda S., Martínková J., Chládek J., Anzenbacher P.: *Remedia* 8, 98 (1998).
2. Marez D., Legrand M., Sabbagh N., Lo Guidice J.-M., Spire C., Lafitte J.J., Meyer U. A., Broly F.: *Pharmacogenetics* 7, 193 (1995).
3. Jones D. R., Horski C. J., Hamman M. A., Hall S. D.: *J. Chromatogr. B* 678, 105 (1996).
4. East T., Dye D.: *J. Chromatogr.* 338, 99 (1985).
5. Ducharma J., Abdullah S., Wainer I. W.: *J. Chromatogr. B* 678, 113 (1996).
6. Lam Y. W. F., Rodriguez S. Y.: *Ther. Drug Monit.* 15, 300 (1993).
7. Alván G., Bechtel P., Iselius L., Gundert-Remy U.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 39, 533 (1990).
8. Ulč, I., Ulč J., Čepeláková H.: *Cas. Lek. Cesk.* 129, 244 (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 Urine

An HPLC method for determination of dextromethorphan (DM), dextropran (DEX), methoxymorphinan (MM) and hydroxymorphinan (HM) in urine with fluorescence detection (excitation and emission wavelength 280 and 310 nm) was elaborated. The mobile phase was acetonitrile – 0.01 M-KH₂PO₄ 3:2, triethylamine 350 μl l⁻¹, pH 3.6; flow rate 0.7 ml.min⁻¹, internal standard betaxolol (BX). For isolation of the substances from urine, liquid-liquid extraction and re-extraction with freezing out the aqueous phase in all extraction steps was used. The extraction yields were 97, 99, 83, 92 and 101 % for DM, DEX, HM, MM and BX, respectively. The method was used for determination of phenotype of cytochrome P 450 of isoenzyme 2D6 in a set of 102 healthy, unrelated volunteers from Czech population. In dependence on molar concentration ratios of DM and DEX in urine (metabolic ratio, MP), seven volunteers (6.9 %) were classified as slow and 95 (93.1 %) as rapid metabolizers of DM (MP < 0.3). The median in the former group was 1.3 (0.37–4.6) and 0.007 (0.0001–0.18) in the latter.

Ústav jaderného výzkumu Řež a.s. přijme do centrální analytické laboratoře

1 pracovníka výzkumu a vývoje

pro oblast analýzy jaderných materiálů metodami hmotnostní spektrometrie, příp. analýzy vzorků životního prostředí na obsah radionuklidů a těžkých kovů.

Požadavky: VŠ vzdělání v oblasti jaderné nebo analytické chemie, praxe v oboru, znalost anglického jazyka, práce na PC, schopnost samostatné práce a rozhodování. Vědecká hodnota vítána.

Nabízíme: možnost realizace ve vedení pracovních týmů, možnost odborného růstu, účast v mezinárodních projektech, odpovídající platové podmínky.

Kontakt: ÚVJ Řež a.s., divize reaktorových služeb, 250 68 Řež, RNDr. Málek, CSc., tel. 02/6617 2485, nebo Ing. Kysela, CSc., tel. 02/6617 3526