

# Разработка и валидация методики количественного определения порфиринов методом ВЭЖХ-УФ в моче

Кильдюшкин Д. А.<sup>1</sup>, Петухов А. Е.<sup>1</sup>, Литвин Е. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова

Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Россия

<sup>2</sup> – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр  
детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

**Аннотация.** Порфирии — это группа орфанных патологических нарушений в пути биосинтеза гема, которые тяжело поддаются диагностике. В настоящее время не существует универсального метода анализа данной группы заболеваний. Система обращённо-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектором может быть использована для определения различных порфиринов в моче пациентов. Идентификация синтезируемых в организме порфиринов была проведена на системе Waters Acquity UPLC H-CLASS с диодно-матричным детектором. С помощью разработанного метода были определены одновременно 9 маркеров в 8 точках нарушения биосинтеза гема и внутренний стандарт. Разработанный метод обращённо-фазовой ВЭЖХ может быть использован при диагностировании порфирий.

**Ключевые слова:** порфирии; высокоэффективная жидкостная хроматография; УФ-детектор; порфирины; гем

## Для цитирования:

Кильдюшкин Д. А., Петухов А. Е., Литвин Е. А. Разработка и валидация методики количественного определения порфиринов методом ВЭЖХ-УФ в моче. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(2):36–45. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-36-45>

**Поступила:** 02 июня 2022 г. **Принята:** 08 июня 2022 г. **Опубликована:** 30 июня 2022 г.

## Development and validation of a method for porphyrins quantification using HPLC-UV in urine

Kildyushkin DA<sup>1</sup>, Petukhov AE<sup>1</sup>, Litvin EA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovskiy University), Moscow, Russia

<sup>2</sup> – Federal State Budgetary Institution «Federal research center of pediatric hematology, oncology and immunology named after Dmitry Rogachev» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

**Abstract.** Porphyrias are the group of orphan diseases, related to pathological disruptions of heme biosynthesis. These diseases are hard to diagnose timely and existing methods lack universality. High performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detector could be adapted for this purpose via determination of porphyrins in human urine. Waters Acquity UPLC H-CLASS with diode matrix was used in this study. Developed method allows determining the inner standard and 9 biomarkers, each connected to specific stage of heme biosynthesis. Developed method is validated for porphyrias diagnosis.

**Keywords:** porphyrias; high performance liquid chromatography; UV-determination; porphyrins; heme

## For citations:

Kildyushkin DA, Petukhov AE, Litvin EA. Development and validation of a method for porphyrins quantification using HPLC-UV in urine. *Farmakokinetika i farmakodinamika* = *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(2):36–45. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-36-45>

**Received:** June 02, 2022. **Accepted:** June 08, 2022. **Published:** June 30, 2022.

## Введение / Introduction

Порфирии — это заболевания, которые отнесены к группе орфанных, которые к тому же обладают сложностями при диагностировании. Также у этих заболеваний низкая специфичность клинических проявлений и латентность протекания патологии. Поэтому для успешной терапии пациентов необходима своевременная диагностика. К различным типам порфирий приводят нарушения, связанные с ферментами, регулируемыми превращения одних порфиринов в другие и участвующими в пути биосинтеза гема.

Данные заболевания считаются редкими во всём мире, к примеру, в США от различных типов страдает менее 200 000 человек, в Швеции распространённость одного из типов порфирий (острая перемежающаяся-

ся порфирия) насчитывает 1/75 000 жителей [1, 2]. В России же, как сказано выше, данное заболевание причислено к группе орфанных с числом заболевших 10/100 000 человек, по заключению Национального гематологического сообщества [3].

Порфирины — природные и синтетические тетра-пиррольные соединения, формально — производные порфина, предшественники гема, лишённые железа. Это — малорастворимые в воде вещества, проявляющие кислотные свойства. Эти соединения имеют хромофорные группы и сопряжённые электронные системы, которые дают окрашивание в видимом спектре от розового до коричневого, интенсивно флуоресцируют в диапазоне 600–730 нм [4, 5].

Существуют различные методы обнаружения порфиринов, обладающие своими недостатками и преимуществами.

Ферментные тесты имеют высокую чувствительность и селективность, требуют небольших объёмов исследуемого материала. Применяются при диагностике острой перемежающейся порфирии для анализа порфобилиногендеаминазы эритроцитов. Но для выявления порфирий используются редко, так как маркёры этой группы заболеваний зачастую нестабильны [6]. Данные тесты трудны в воспроизведении и требовательны к специфическим типам тканей, такими как культивируемые фибробласты, лимфоциты или биопсийный материал печени.

Генетические тесты — это одни из самых точных методов на сегодняшний день, но чаще они являются уточняющими методами диагностики, так как требуют предварительного сбора анамнеза у родственников, биохимических тестов, к тому же занимают много времени для их проведения [7] и требуют специфического оборудования.

Характерные физико-химические свойства порфиринов открывают возможность анализировать их при помощи методов ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) и ГЖХ (газо-жидкостная хроматография). Хроматография — аналитический метод, используемый для разделения многокомпонентных смесей. Он основан на распределении веществ между неподвижной фазой (сорбентом) и подвижной (жидкость, элюент) и на различном сродстве компонентов пробы к этим фазам. Сам процесс распределения веществ (их взаимодействие с НФ) зависит от таких качеств вещества, как их размерность, полярность или способность к связыванию [8].

Метод ГЖХ обладает хорошей чувствительностью и селективностью, а именно способностью при изменениях свойств жидкой фазы разделять очень близкие по свойствам вещества. Но применим данный метод только к газообразным и термостабильным веществам. Для других соединений требуется предварительная дериватизация, что увеличивает время и этапы пробоподготовки [9].

При нормально-фазовой хроматографии стационарная фаза полярная (силикагель со свободными силанольными группами), подвижная фаза должна быть неполярная (гептан, уксусный эфир и др.). У обращённо-фазовой хроматографии полярность фаз противоположна: стационарная фаза — неполярная (поверхность силикагеля покрыта гидрофобными функциональными группами), а подвижная фаза — полярная (вода; полярные органические растворители, такие как ацетонитрил и метанол). Обращённо-фазовые системы применяются чаще, так как используемые растворители (вода, метанол, ацетонитрил) прозрачны для УФ-волн, что позволяет проводить исследования в широком УФ-диапазоне.

Порфирины и их производные обладают интенсивной полосой поглощения на границе между ультрафиолетом и видимой областью (около 400 нм): полоса Core [10, 11], что открывает возможность использовать диодную матрицу — доступный и недорогой детектор.

Стационарность оптической системы способна уловить сигналы от порфиринов и обеспечить высокую точность измерения во всем спектральном диапазоне.

При использовании системы ВЭЖХ для определения порфиринов не требуется наличия узкопрофильных специалистов или дорогостоящего оборудования. С учётом вышесказанного на данный момент ВЭЖХ является самой распространённой методикой для диагностики порфирий.

В настоящем исследовании применён метод обращённо-фазной ВЭЖХ с УФ-детектированием. Количественное определение проводили методом внутреннего стандарта, чтобы учесть внутрисерийную индивидуальную вариацию сигналов, добавляемого к образцам в определённой концентрации.

С помощью разработанного метода были определены единовременно 9 маркёров в 8 точках нарушения биосинтеза гема, сам гем и внутренний стандарт.

## Материалы и методы / Materials and methods

### Реагенты / Reagents

Стандарты порфиринов, включающие уропорфирин I, уропорфирин III, гептакарбоксилпорфирин I, гексакарбоксилпорфирин I, пентакарбоксилпорфирин I, копропорфирин I, копропорфирин III, мезопорфирин IX и протопорфирин IX, были приобретены в Thermo Fisher Scientific, США. 2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX, используемый в качестве внутреннего стандарта, также был получен от Thermo Fisher Scientific, США.

Метанол квалификации «для ВЭЖХ» приобретён у Thermo Fisher Scientific, США. Соляная кислота, уксусная кислота и аммония ацетат приобретены у Sigma-Aldrich, США. Вода деионизованная получена в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ.

### Оборудование / Equipment

Хроматограф Waters Acquity UPLC H-CLASS со следующими модулями: диодно-матричным детектором ACQ-PDA eλ, термостатом ACQ-CM, автосэмплером ACQ-FTN и насосным блоком ACQ-QSM.

Неподвижная фаза: колонка Phenomenex Luna® C18(2) 250\*4.6 мм, зернением 5 мкм и с предколонкой-фильтром Waters 0,2 мкм.

Подвижная фаза: двухкомпонентный градиент:

А — 1М раствор аммония ацетата в воде, доведённый до pH 5,16 при помощи уксусной кислоты;

В — 100 % метанол.

Подвижная фаза подавалась градиентом со скоростью потока, равной 0,9 мл/мин (здесь и далее указан процент фазы В): 0 мин — 20 %; 2 мин — 20 %; 25 мин — 100 %; 30 мин — 100 %; 31 мин — 20 %; 33 мин — 100 %; 35 мин — 100 %; 36 мин — 20 %; 41 мин — 20 %.

Термостат. Температура колонки в процессе анализа была комнатной: 25±2 °C.

Детектор. Диодная матрица с монохроматором, выставленным на  $400 \pm 1,2$  нм.

Объём вкола: 10 мкл.

Анализ хроматограмм проводили при помощи программного обеспечения Empower 3.0, калибровочные кривые были построены в Origin 7.0.

#### Приготовление калибровочных растворов / Preparation of calibration solutions

Растворы индивидуальных порфиринов были приготовлены из стандартных стоковых растворов, содержащих 2 мкМ соответствующих порфиринов, в диапазонах концентраций: 0; 32,25; 67,5; 125; 250; 500 и 1000 нМ, разведённых в 2М соляной кислоте и донорской моче.

#### Пробоподготовка / Sample preparation

К 500 мкл калибровочных растворов прибавляли 500 мкл 2М соляной кислоты и 50 мкл внутреннего стандарта. Пробоподготовку проводили в непрозрачных эппендорфах, защищённых от света. Полученную смесь помещали на вортекс (10 мин), после чего центрифугировали 10 мин при 14000 g. Надосадочную жидкость отбирали и вводили в хроматограф.

#### Калибровка / Calibration

Калибровочные кривые строили по семи точкам для каждого из исследуемых соединений. Калибровочные кривые были построены методом наименьших квадратов линейной регрессией.

#### Образцы / Samples

Для данной методики использовался биологический материал — моча от доноров-добровольцев, давших своё согласие.

#### Валидация / Validation

Валидация оценивается по следующим основным параметрам:

- правильность;
- прецизионность;
- предел обнаружения;
- нижний предел количественного определения;
- эффект матрицы;
- линейность;
- селективность.

#### Результаты и обсуждение / Results and discussion

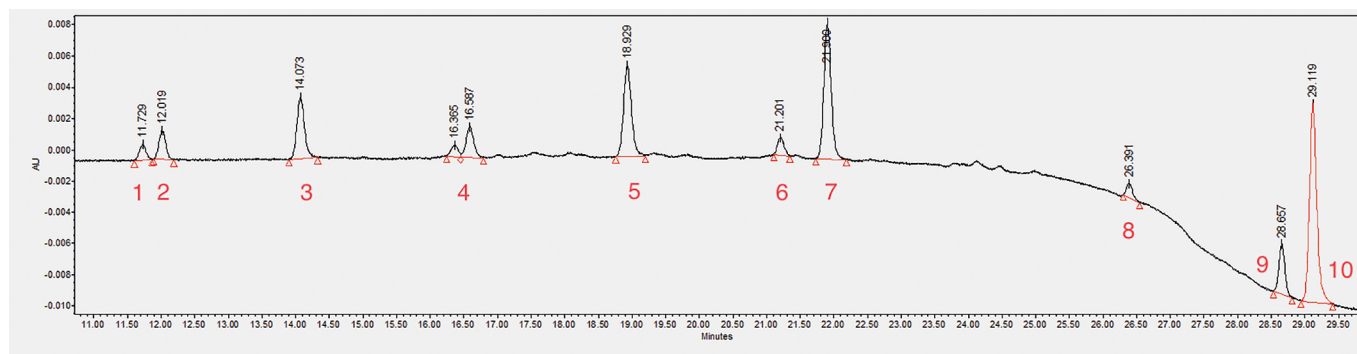
#### Валидация / Validation

##### Селективность / Selectivity

Как видно на хроматограммах стандартов порфиринов на рис. 1 и 2, свободные порфирины выходят в течение 30 мин. Хроматограммы показывают, что эндогенные соединения в моче не оказывают влияния на определение порфиринов и ВС, что и предопределяет высокую селективность.

Разработанный метод позволяет разделить изомеры не только уропорфирина (уропорфирин I и уropорфирин III), но и копропорфирина (копропорфирина I и копропорфирин III), что показано на рис. 3–6 в разных концентрациях. Времена удержания (RT, мин) подписаны на самих рисунках.

По строению эти изомеры очень близки: они различаются лишь в 17 и 18 радикалах у уропорфиринов (остаток пропионовой и уксусной кислот) [11, 12] и копропорфиринов ( $\text{CH}_3$ - и остаток пропионовой кислоты) [13]. Для разработанного метода фактор разделения ( $\alpha$ ) для уропорфиринов составляет 1,03, а для копропорфиринов — 1,04. Разрешение составляет 2,76 и 6,66, соответственно.

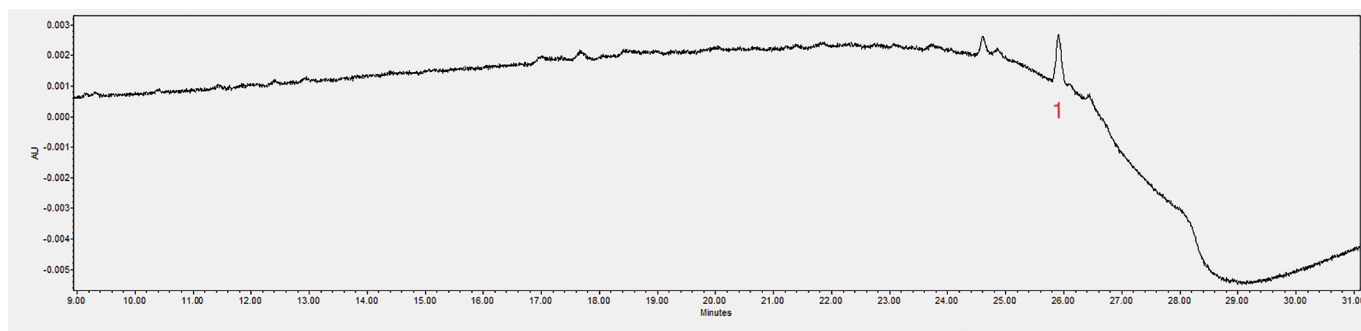


**Рис. 1.** Хроматограмма стандартов порфиринов в моче при индивидуальных концентрациях 500 нМ

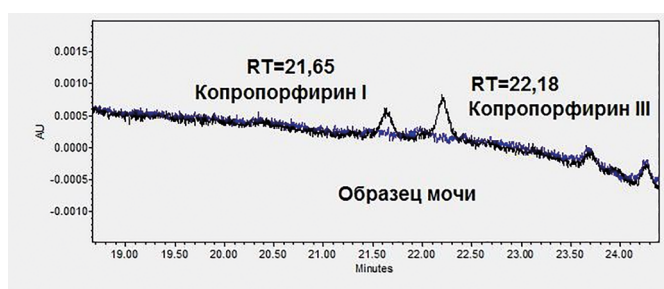
**Fig. 1.** Chromatogram of mix of 500 nM porphyrin standards in intact donor urine

*Примечания:* Времена удержания (мин) подписаны над пиками. 1 — уропорфирин I; 2 — уропорфирин III; 3 — гептацирбоксилпорфирин I; 4 — гексацирбоксилпорфирин I; 5 — пентацирбоксилпорфирин I; 6 — копропорфирин I; 7 — копропорфирин III; 8 — внутренний стандарт (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX); 9 — мезопорфирин IX; 10 — протопорфирин IX.

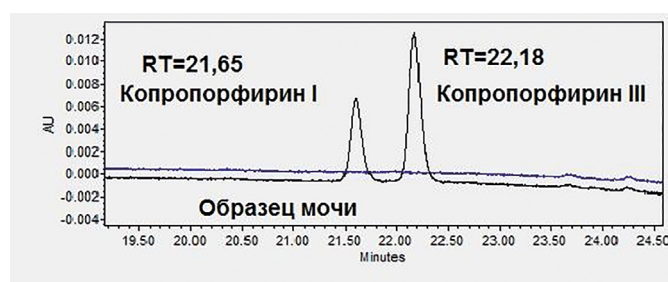
*Notes:* Retention times (min) are marked above each peak. 1 — Uroporphyrin I, 2 — Uroporphyrin III, 3 — Heptacarboxylporphyrin I, 4 — Hexacarboxylporphyrin I, 5 — Pentacarboxylporphyrin I, 6 — Coproporphyrin I, 7 — Coproporphyrin III, 8 — internal standard, 9 — Mesoporphyrin IX, 10 — Protoporphyrin IX.



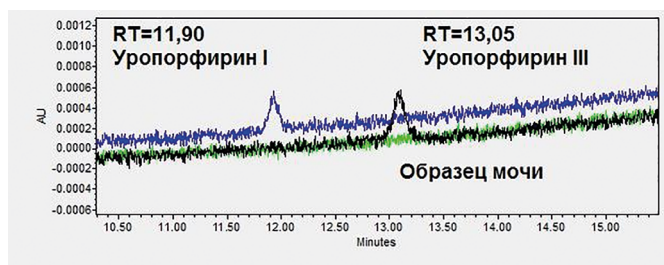
**Рис. 2.** Хроматограмма донорской мочи с добавлением внутреннего стандарта (1) в концентрации 95 нМ  
**Fig. 2.** Chromatogram of donor urine with 95 nM internal standard (marked as 1)



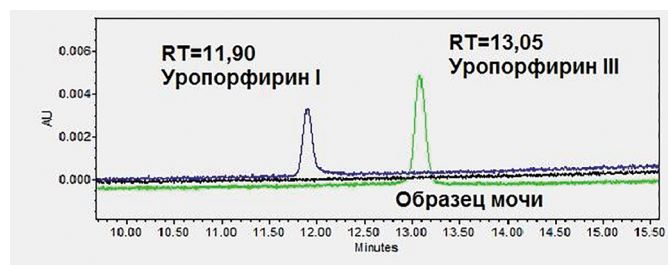
**Рис. 3.** Хроматограмма стандартов копропорфиринов I и III в концентрации 62,5 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (синий)  
**Fig. 3.** Chromatogram of coproporphyrin I and III standards at 62,5 nM compared with intact human urine (blue)



**Рис. 4.** Хроматограмма стандартов копропорфиринов I и III в концентрации 500 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (синий)  
**Fig. 4.** Chromatogram of coproporphyrin I and III standards at 500 nM compared with intact human urine (blue)



**Рис. 5.** Хроматограмма стандартов уропорфиринов I и III в концентрации 62,5 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (зелёный)  
**Fig. 5.** Chromatogram of uroporphyrin I and III standards at 62,5 nM compared with intact human urine (green)



**Рис. 6.** Хроматограмма стандартов уропорфиринов I и III в концентрации 500 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (чёрный)  
**Fig. 6.** Chromatogram of uroporphyrin I and III standards at 500 nM compared with intact human urine (black)

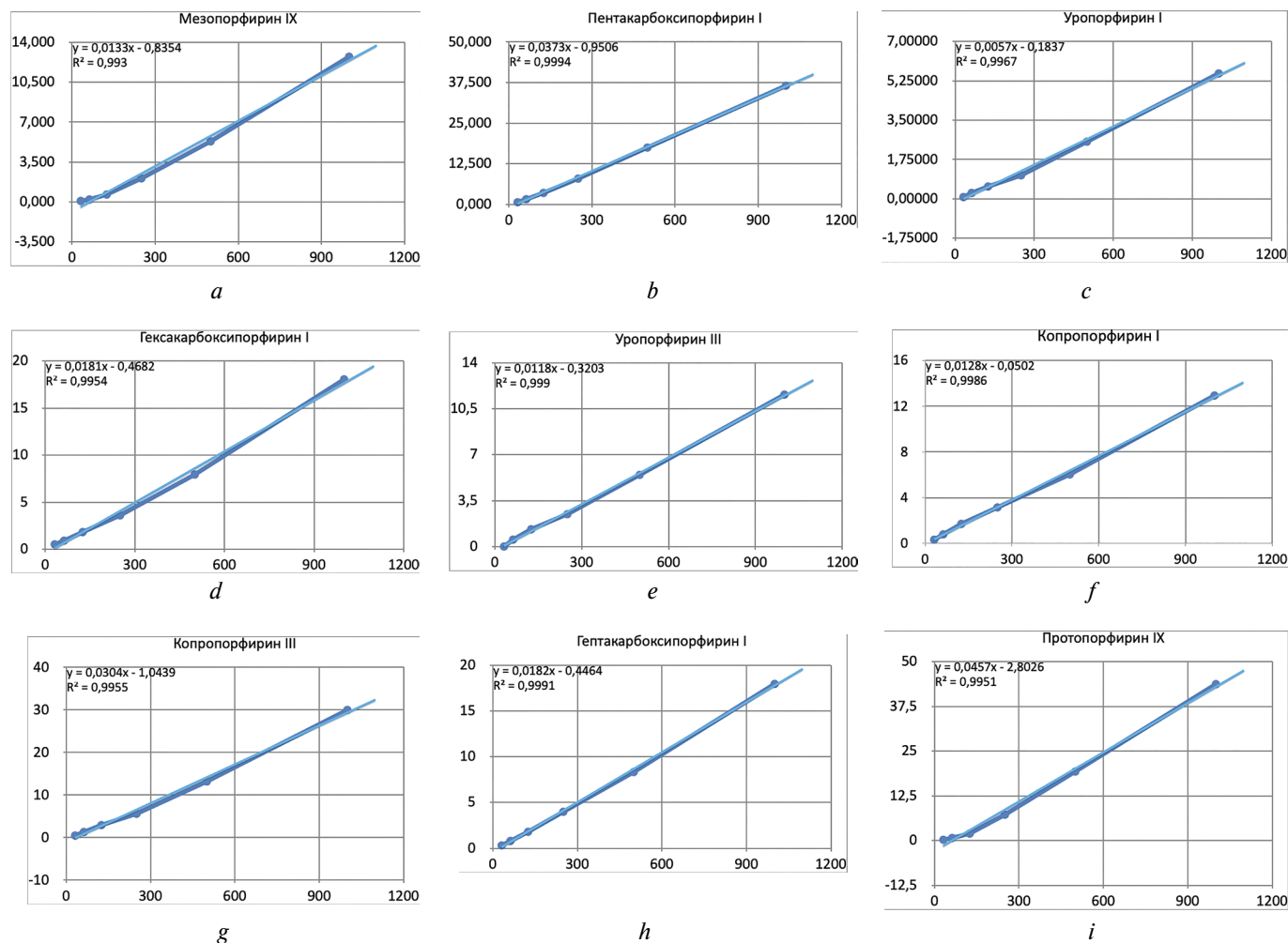
### Линейность / Linearity

При определении линейности был проведён анализ 9 донорских образцов с прибавлением стандартных растворов уропорфирина I, уропорфирина III, гептакарбоксилпорфирина I, гексакарбоксилпорфирина I, пентакарбоксилпорфирина I, копропорфирина I, копропорфирина III, мезопорфирина IX и протопорфирина IX до получения концентраций: 0; 32,25; 62,5; 125; 250; 500 и 1000 нМ. По полученным значениям построены калибровочные кривые. Данные пред-

ставлены на рис. 7. Выявлена линейная зависимость между отношением площадей пиков порфиринов и ВС от концентраций.

### Прецизионность и правильность / Precision and accuracy

Оценка прецизионности и правильности методики была проведена на основании анализа 9 стандартов в 5 различных концентрациях: 62,5; 125; 250; 500 и 1000 нМ. Измерения проводили в шести повторях. После измерений были посчитаны следующие статистические параметры:



**Рис. 7.** Калибровочные кривые порфиринов (a – i)

**Fig. 7.** Calibration curves for individual porphyrins (a – i)

*Примечания:* По оси Y — отношения площадей пиков стандартов порфиринов к площади внутреннего стандарта. По оси X — концентрации порфиринов от 0 до 1000 нМ. На графиках указаны уравнения для линии тренда (голубая) и значения  $R^2$ ; a — мезопорфирин IX; b — пентакарбоксипорфирин I; c — уропорфирин I; d — гексакарбоксипорфирин I; e — уропорфирин III; f — копропорфирин I; g — копропорфирин III; h — гептакарбоксипорфирин I; i — протопорфирин IX.

*Notes:* Y axis is ratio of porphyrin standard peak area to IS peak area. X axis is porphyrin concentrations from 0 to 1000 nM. Trend lines (light blue), their equations and  $R^2$  values are indicated on each graphics; a — mesoporphyrin IX; b — pentacarboxyporphyrin I; c — uroporphyrin I; d — hexacarboxyporphyrin I; e — uroporphyrin III; f — coproporphyrin I; g — coproporphyrin III; h — heptacarboxyporphyrin I; i — protoporphyrin IX.

1. Среднее значение ( $\bar{x}$ , нМ);
  2. Стандартное отклонение (SD, нМ);
  3. Коэффициент вариации (CV, %);
  4. Стандартная ошибка среднего (SE, нМ);
  5. Предел относительной погрешности ( $\epsilon$ , %).
- Результаты анализа представлены в табл. 1–9.

#### Нижний предел количественного определения / Lower limit of quantitation

Нижний предел количественного определения (НПКО) методики определяли, исходя из представленных данных о линейности, правильности и прецизионности. НПКО данных стандартов был выбран на уровне 62,5 нМ, чтобы позволило определять их в парах и с высокой точностью. На рис. 8 и 9 представлены хроматограммы гептакарбоксипорфирина

I и пентакарбоксипорфирина I на уровне НПКО в сравнении с фоном — донорской мочой (красные графики). Времена удержания (RT, мин) подписаны на самих рисунках.

#### Эффект матрицы / Matrix effect

С целью изучения влияние матричного эффекта сравнивали образцы мочи с водными растворами (с добавлением HCl 2 нМ) порфиринов. Матричный фактор (MF) определен как частное среднего значения площадей хроматографического пика в образцах мочи и среднего значения площадей хроматографических пиков в водных образцах сравнения. CV для MF составил меньше 15 %. Из этого следует вывод, что разбросы в значениях при анализе проб удовлетворительны, а сам матричный эффект стабильный.

Таблица 1

Показатели прецизионности и правильности мезопорфирина IX

Table 1

Precision and accuracy parameters for mesoporphyrin IX

| Истинные концентрации, нМ | Статистические параметры |       |       |       |            |
|---------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|------------|
| X                         | $\bar{x}$                | SD    | CV    | SE    | $\epsilon$ |
| 1 000                     | 1 007,84                 | 37,49 | 3,72  | 15,30 | 0,78       |
| 500                       | 503,15                   | 41,72 | 8,29  | 17,03 | 0,63       |
| 250                       | 251,28                   | 26,29 | 10,46 | 10,73 | 0,51       |
| 125                       | 114,64                   | 22,21 | 19,37 | 9,07  | –8,29      |
| 62,5                      | 62,78                    | 3,70  | 5,89  | 1,51  | 0,45       |

Таблица 2

Показатели прецизионности и правильности пентакарбоксипорфирина I

Table 2

Precision and accuracy parameters for pentacarboxyporphyrin I

| Истинные концентрации, нМ | Статистические параметры |       |       |       |            |
|---------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|------------|
| X                         | $\bar{x}$                | SD    | CV    | SE    | $\epsilon$ |
| 1 000                     | 1 004,11                 | 37,07 | 3,69  | 15,14 | 0,41       |
| 500                       | 506,99                   | 27,04 | 5,33  | 11,04 | 1,40       |
| 250                       | 247,03                   | 34,17 | 13,83 | 13,95 | –1,19      |
| 125                       | 126,32                   | 19,58 | 15,50 | 7,99  | 1,05       |
| 62,5                      | 62,56                    | 5,85  | 9,35  | 2,39  | 0,10       |

Таблица 3

Показатели прецизионности и правильности копропорфирина I

Table 3

Precision and accuracy parameters for coproporphyrin I

| Истинные концентрации, нМ | Статистические параметры |       |       |       |            |
|---------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|------------|
| X                         | $\bar{x}$                | SD    | CV    | SE    | $\epsilon$ |
| 1 000                     | 1 040,05                 | 59,52 | 5,72  | 24,30 | 4,01       |
| 500                       | 484,15                   | 32,76 | 6,77  | 13,37 | –3,17      |
| 250                       | 232,68                   | 27,66 | 11,89 | 11,29 | –6,93      |
| 125                       | 139,81                   | 34,86 | 24,93 | 14,23 | 11,85      |
| 62,5                      | 61,40                    | 9,93  | 16,18 | 4,05  | –1,76      |

Таблица 4

Показатели прецизионности и правильности протопорфирина IX

Table 4

Precision and accuracy parameters for protoporphyrin IX

| Истинные концентрации, нМ | Статистические параметры |       |       |      |            |
|---------------------------|--------------------------|-------|-------|------|------------|
| X                         | $\bar{x}$                | SD    | CV    | SE   | $\epsilon$ |
| 1 000                     | 1 003,21                 | 24,23 | 2,42  | 9,89 | 0,32       |
| 500                       | 496,25                   | 15,01 | 3,02  | 6,13 | –0,75      |
| 250                       | 241,39                   | 19,74 | 8,18  | 8,06 | –3,44      |
| 125                       | 112,33                   | 14,78 | 13,15 | 6,03 | –10,14     |
| 62,5                      | 60,03                    | 8,51  | 14,17 | 3,47 | –3,95      |

Таблица 5

Показатели прецизионности и правильности уропорфирина I

Table 5

Precision and accuracy parameters for uroporphyrin I

| Истинные концентрации, нМ | Статистические параметры |       |       |       |            |
|---------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|------------|
| X                         | $\bar{x}$                | SD    | CV    | SE    | $\epsilon$ |
| 1 000                     | 1 018,50                 | 35,88 | 3,52  | 14,65 | 1,85       |
| 500                       | 498,85                   | 41,71 | 8,36  | 17,03 | −0,23      |
| 250                       | 244,20                   | 25,23 | 10,33 | 10,30 | −2,32      |
| 125                       | 123,30                   | 14,18 | 11,50 | 5,79  | −1,36      |
| 62,5                      | 60,87                    | 15,21 | 24,98 | 6,21  | −2,61      |

Таблица 6

Показатели прецизионности и правильности гексакарбоксиуропорфирина I

Table 6

Precision and accuracy parameters for hexacarboxyporphyrin I

| Истинные концентрации, нМ | Статистические параметры |       |       |       |            |
|---------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|------------|
| X                         | $\bar{x}$                | SD    | CV    | SE    | $\epsilon$ |
| 1 000                     | 1 014,80                 | 22,77 | 2,24  | 9,30  | 1,48       |
| 500                       | 461,38                   | 34,69 | 7,52  | 14,16 | −7,72      |
| 250                       | 245,19                   | 23,93 | 9,76  | 9,77  | −1,93      |
| 125                       | 125,67                   | 12,51 | 9,95  | 5,11  | 0,53       |
| 62,5                      | 70,37                    | 10,12 | 14,39 | 4,13  | 12,59      |

Таблица 7

Показатели прецизионности и правильности гептакарбоксиуропорфирина I

Table 7

Precision and accuracy parameters for heptacarboxyporphyrin I

| Истинные концентрации, нМ | Статистические параметры |       |       |       |            |
|---------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|------------|
| X                         | $\bar{x}$                | SD    | CV    | SE    | $\epsilon$ |
| 1 000                     | 973,07                   | 53,09 | 5,46  | 21,67 | −2,69      |
| 500                       | 485,92                   | 32,59 | 6,71  | 13,30 | −2,82      |
| 250                       | 241,77                   | 16,75 | 6,93  | 6,84  | −3,29      |
| 125                       | 128,72                   | 17,42 | 13,53 | 7,11  | 2,97       |
| 62,5                      | 69,52                    | 12,66 | 18,21 | 5,17  | 11,23      |

Таблица 8

Показатели прецизионности и правильности уропорфирина III

Table 8

Precision and accuracy parameters for uroporphyrin III

| Истинные концентрации, нМ | Статистические параметры |       |       |       |            |
|---------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|------------|
| X                         | $\bar{x}$                | SD    | CV    | SE    | $\epsilon$ |
| 1 000                     | 1 039,34                 | 50,33 | 4,84  | 20,55 | 3,93       |
| 500                       | 500,86                   | 20,08 | 4,01  | 8,20  | 0,17       |
| 250                       | 232,97                   | 22,38 | 9,61  | 9,14  | −6,81      |
| 125                       | 120,76                   | 13,04 | 10,80 | 5,32  | −3,39      |
| 62,5                      | 59,03                    | 11,01 | 18,65 | 4,49  | −5,55      |

Таблица 9

Показатели прецизионности и правильности копропорфирина III

Table 9

Precision and accuracy parameters for coproporphyrin III

| Истинные концентрации, нМ | Статистические параметры |        |       |       |            |
|---------------------------|--------------------------|--------|-------|-------|------------|
| X                         | $\bar{x}$                | SD     | CV    | SE    | $\epsilon$ |
| 1 000                     | 1 008,60                 | 49,09  | 4,87  | 20,04 | 0,86       |
| 500                       | 536,11                   | 114,70 | 21,40 | 46,83 | 7,22       |
| 250                       | 240,89                   | 27,75  | 11,52 | 11,33 | −3,64      |
| 125                       | 117,76                   | 10,27  | 8,72  | 4,19  | −5,80      |
| 62,5                      | 63,28                    | 10,64  | 16,82 | 4,35  | 1,24       |

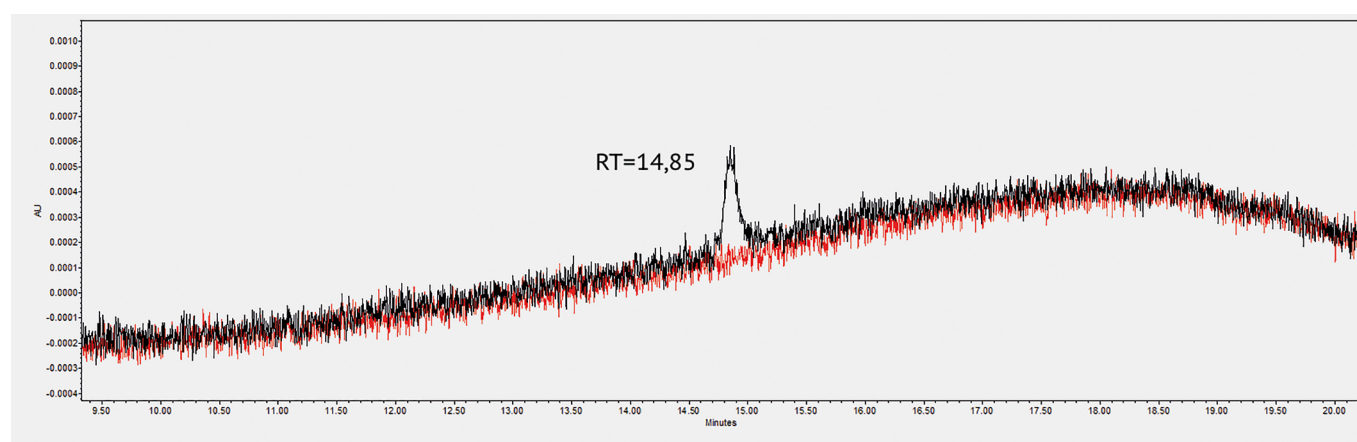


Рис. 8. Хроматограмма стандарта гептакарбоксипорфирина I в концентрации 62,5 нМ  
Fig. 8. Chromatogram of 62,5 nM heptacarboxyporphyrin I standard compared to intact urine (red)

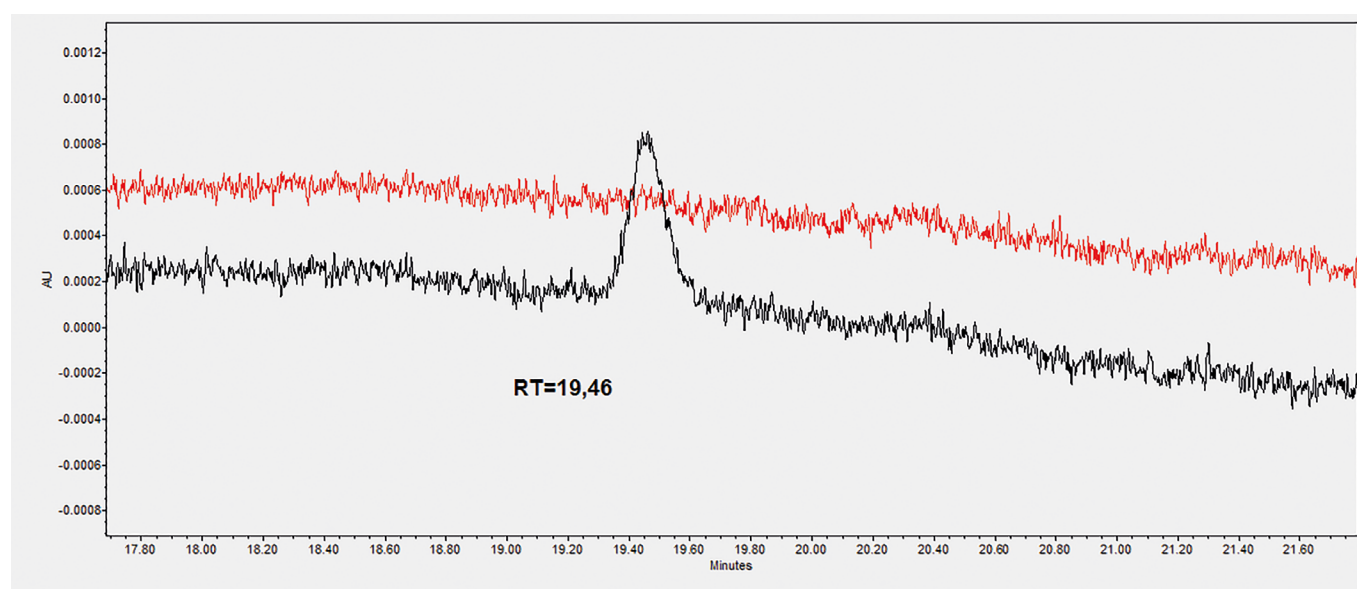
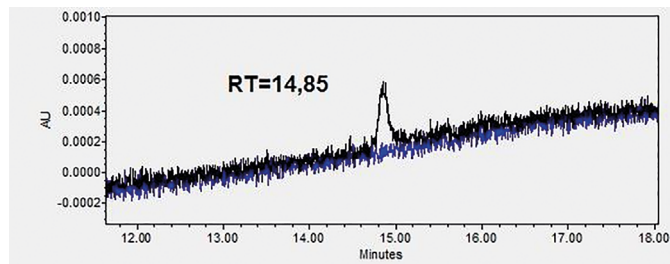


Рис. 9. Хроматограмма стандарта пентакарбоксипорфирина I в концентрации 62,5 нМ  
Fig. 9. Chromatogram of 62,5 nM pentacarboxyporphyrin I standard compared to intact urine (red)

### Предел обнаружения / Limit of detection

Наименьшая концентрация порфиринов, которую данная методика позволяет надёжно отделить от фонового шума [14] при анализе образцов мочи, равняется 31,25 нМ. На рис. 10 представлен пример гептакарбоксипорфирина I в сравнении с фоном — донорской мочой (синий график). Время удержания (RT, мин) подписано на самом рисунке.



**Рис. 10.** Хромотограмма стандарта гептакарбоксипорфирина I в концентрации 31,25 нМ

**Fig. 10.** Chromatogram of 31,25 nM heptacarboxyporphyrin I standard compared to intact urine (blue)

### Заключение / Conclusion

Адаптированная методика количественного определения различных типов порфиринов методом ВЭЖХ с УФ-детектированием является надёжной, свободной от помех, а также подходит для специфического количественного определения порфиринов в моче человека. Во время валидации данной методики были установлены:

1. Значения НПКО и предела обнаружения.
2. Соответствие требованиям по селективности, точности, прецизионности и линейности проходит по требованиям руководств по валидации аналитических методик ICH, ЕМА, Британской фармакопеи и USP 31 издания, а также ОФС ГФ XIV издания [15–21].

**Конфликт интересов.** Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

**Conflict of interest.** The authors of the article confirmed the absence of a conflict of interest, which must be reported.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Кильдюшкин Даниил Андреевич**

*Автор, ответственный за переписку*

e-mail: kildan@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8807-2145>

Аспирант структурного отделения: кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

**Kildyushkin Daniil A.**

*Corresponding author*

e-mail: kildan@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8807-2145>

Postgraduate at the Department of Pharmaceutical and Toxicological chemistry A. P. Arzamascev, FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow, Russia

**Петухов Алексей Евгеньевич**

e-mail: a-l-e-x4@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4855-4235>

к. ф. н., доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

**Petukhov Alexey E.**

e-mail: a-l-e-x4@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4855-4235>

PhD Pharm Sci., Associate Professor at the Department of Pharmaceutical and Toxicological chemistry A. P. Arzamascev, FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow, Russia

**Литвин Евгений Александрович**

e-mail: evgeny.litvin@fccho-moscow.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6331-5339>

к. б. н., н. с. лаборатории фундаментальной и прикладной фармакологии ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва, России

**Litvin Evgeny A.**

e-mail: evgeny.litvin@fccho-moscow.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6331-5339>

PhD Biological Sci., Scientific at Laboratory of applied and fundamental pharmacology, D. Rogachev FRCPHOI, Moscow, Russia

## Список литературы / References

1. Badminton MN, Elder GH. Molecular mechanisms of dominant expression in porphyria. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28(3):277–286. DOI: 10.1007/s10545-005-8050-3.
2. Nordmann Y, Puy H. Human hereditary hepatic porphyrias. *Clin Chim Acta*. 2002 Nov;325(1-2):17–37. DOI: 10.1016/S0009-8981(02)00276-0.
3. Витковская И.П., Законодательные основы организации оказания медицинской помощи пациентам с орфанными заболеваниями в Москве. ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ»; Апрель 25, 2017; Москва. [Vitkovskaya IP, Zakonodatel'nye osnovy organizatsii okazaniya meditsinskoy pomoshchi patsientam s orfannymi zabolevaniyami v Moskve. GBU «NIIOZMM DZM»; 2017 apr 25; Moskva (In Russ).]. Доступно по: <https://docplayer.com/amp/72312944-Zakonodatelnye-osnovy-organizatsii-okazaniya-meditsinskoy-pomoshchi-patsientam-s-orfannymi-zabolevaniyami-v-moskve.html>. Ссылка активна на 12.04.2022.
4. Quiroz-Segoviano RI, Serratos IN, Rojas-González F, et al. On tuning the fluorescence emission of porphyrin free bases bonded to the pore walls of organo-modified silica. *Molecules*. 2014 Feb 21;19(2):2261–2285. DOI: 10.3390/molecules19022261.
5. Macours P, Cotton F. Improvement in HPLC separation of porphyrin isomers and application to biochemical diagnosis of porphyrias. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(12):1433–1440. DOI: 10.1515/CCLM.2006.266.
6. Hindmarsh JT. Enzyme assays and the porphyrias: which tissues and when indicated. *Clin Dermatol*. 1998 Mar-Apr;16(2):245–250. DOI: 10.1016/S0738-081X(97)00204-6.
7. Crossley BM, Bai J, Glaser A, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J Vet Diagn Invest*. 2020 Nov;32(6):767–775. DOI: 10.1177/1040638720905833.
8. McMurry J. Organic chemistry: with biological application. 2nd ed. Belmont, (CA): Brooks/Cole. pp. 395; 2011.
9. Тыжигирова В.В. Газовая хроматография. Краткая характеристика метода и его применение в фармацевтическом анализе: учебное пособие. [Tyzhigirova VV. Gazovaya khromatografiya. Kratkaya kharakteristika metoda i ego primenenie v farmatsevticheskom analize: uchebnoe posobie. (In Russ).]. URL: [https://www.ismu.baikal.ru/src/downloads/0c969d9c\\_gazovaya\\_hromatografiya\\_2016.pdf](https://www.ismu.baikal.ru/src/downloads/0c969d9c_gazovaya_hromatografiya_2016.pdf). Ссылка активна на 15.04.22.
10. Huang W, Liu Q, Zhu EY, Shindi AA, Li YQ. Rapid simultaneous determination of protoporphyrin IX, uroporphyrin III and coproporphyrin III in human whole blood by non-linear variable-angle synchronous fluorescence technique coupled with partial least squares. *Talanta*. 2010 Sep 15;82(4):1516–1520. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.07.034.
11. Fortian A, Castaño D, Gonzalez E, et al. Structural, thermodynamic, and mechanistical studies in uroporphyrinogen III synthase: molecular basis

of congenital erythropoietic porphyria. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2011;83:43–74. DOI: 10.1016/B978-0-12-381262-9.00002-1.

12. Walke A, Molina ES, Stummer W, König S. Protoporphyrin IX Analysis from Blood and Serum in the Context of Neurosurgery of Glioblastoma. In: Mitulović G, editor. Mass Spectrometry in Life Sciences and Clinical Laboratory [Internet]. London: IntechOpen; 2020 [cited 2022 April 15]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/74409>. DOI: 10.5772/intechopen.95042.

13. Danton M, Lim CK. Porphyrin profiles in blood, urine and faeces by HPLC/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*. 2006 Jun-Jul;20(6-7):612–621. DOI: 10.1002/bmc.656.

14. Guidelines for the validation and verification of chemical test methods. Published by the National Association of Testing Authorities, Australia (NATA) [cited 2022 April 16]. Available from: [https://catalogo.latu.org.uy/opac\\_css/doc\\_num.php?explnum\\_id=1169](https://catalogo.latu.org.uy/opac_css/doc_num.php?explnum_id=1169).

15. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH Topic Q2 (R1) «Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology». — ICH, Geneva. (1995).

16. FDA Guidance Documents. «Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics». FDA. (Jul., 2015).

17. ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд., М.: МЗ РФ, 2018, Т.1-4. 7019 с. [OFS.1.1.0012.15 Validatsiya analiticheskikh metodik. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiiskoi Federatsii. XIV izd., M.: MZ RF, 2018, T.1-4. 7019 s. (In Russ).]. Доступно по: <https://pharmacopeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik/?amp>. Ссылка активна на 16.04.2022.

18. Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. Утв. Решением коллегии стран ЕЭК от 17.07.2018 № 113. 2018. 26 с. [Rukovodstvo po validatsii analiticheskikh metodik provedeniya ispytaniy lekarstvennykh sredstv. Utv. Resheniem kollegii stran EEK ot 17.07.2018 № 113. 2018. 26 s. (In Russ).]. URL: <https://www.alta.ru/tamdoc/18kr0113/>. Ссылка активна на 16.04.2022.

19. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. М.: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007, 49 с. [Rukovodstvo po validatsii metodik analiza lekarstvennykh sredstv. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya i sotsial'nogo razvitiya RF, 2007, 49 s. (In Russ).]. URL: [http://www.fptl.ru/biblioteka/validatsiya-metodik/rukovodstvo-po-validatsii-analiticheskikh-metodik\\_2007.pdf](http://www.fptl.ru/biblioteka/validatsiya-metodik/rukovodstvo-po-validatsii-analiticheskikh-metodik_2007.pdf). Ссылка активна на 17.04.2022.

20. Pharmacopeia (USP-31) General Chapters: <1225> Validation of compendial methods.

21. ICH Q2B, International Conference on Harmonisation, Validation of analytical procedures. Methodology, (2002).