

ФАРМАКОКИНЕТИКА

МЕТАБОЛИЗМ АФОБАЗОЛА У КРЫС

С. Б. Середенин, А. О. Виглинская, Т. Я. Можаяева, Г. Б. Колыванов,
А. А. Литвин, Н. И. Авдюнина, **В. Л. Савельев**, В. П. Жердев¹

Методами масс-спектрометрии и ВЭЖХ с использованием встречного химического синтеза изучен метаболизм афобазола — 2-(2-морфолиноэтилтио)-5-этоксibenзилимидазола дигидрохлорида. Обнаружено 17 продуктов биотрансформации препарата. Установлена структура 6 метаболитов, остальные охарактеризованы по значениям молекулярных ионов. Сделано заключение, что основными путями биотрансформации афобазола являются гидроксильрование по ароматическому кольцу бензимидазольного цикла и окисление по морфолиновому фрагменту.

Ключевые слова: метаболизм афобазола, масс-спектрометрия, ВЭЖХ

ВВЕДЕНИЕ

В ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН получен оригинальный селективный анксиолитик афобазол — 2-(2-морфолиноэтилтио)-5-этоксibenзилимидазола дигидрохлорид [2, 4, 11].

Целью настоящего исследования явилась идентификация метаболитов афобазола в плазме крови, органах и экскрементах крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали субстанцию афобазола [2-(2-морфолиноэтилтио)-5-этоксibenзилимидазола дигидрохлорид], синтезированную “Etegiegite SpA” (Италия). Предполагаемые метаболиты афобазола: М-3 — 2-(2-морфолиноэтилтио)-5-гидроксibenзилимидазол; М-6 — 2-(2-морфолиноэтилсульфинил)-5-этоксibenзилимидазол; М-7 — 2-(2-оксibenзилиэтилтио)-5-этоксibenзилимидазол; М-11 — 2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)этилтио]-5-этоксibenзилимидазол; М-14 — 2,3-дигидро-6(7)-этокситиазоло[3, 2-а]бензимидазол; сульфен афобазола — 2-(2-морфолиноэтилсульфинил)-5-этоксibenзилимидазол синтезированы в ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН В. Л. Савельевым, Т. Я. Можаяевой и Н. И. Авдюниной.

Исследование проводили на белых беспородных крысах-самцах с массой тела 200 ± 20 г, полученных из питомника «Столбовая» РАМН. Животных содержали на стандартной диете при 12-часовом световом режиме по 10 особей в клетке.

Афобазол растворяли в воде очищенной и вводили в дозе 200 мг/кг внутривенно.

Масс-спектры метаболитов определяли на жидкостном хроматографе с масс-спектрометрическим и диод-

номатричным детектором (Agilent Technologies, модель 1100) со следующими техническими характеристиками: дегазатором модели G1322A, насосом модели G1311A, скоростью потока 0,7 мл/мин. Детектирование проводили в режиме позитивной и негативной ионизации по полному ионному току, напряжение на фрагменторе составило 70 В, температура азота — 350° С, расход — 11 мл/мин, давление небулайзера — 240 кПа, напряжение на капилляре — 3500 В².

Для приготовления подвижной фазы (0,1 М раствора ацетата аммония) 1,54 г порошка растворяли в 200 мл деионизованной воды.

Раствор А: к 50 мл 0,1 М раствора ацетата аммония добавляли 5 мл муравьиной кислоты и доводили объем раствора деионизованной водой до литра. Полученный раствор фильтровали (фильтр Millipore, 0,45 мкм) и дегазировали под вакуумом.

Раствор В: к 50 мл 0,1 М раствора ацетата аммония добавляли 5 мл муравьиной кислоты и доводили объем раствора ацетонитрилом до литра. Полученный раствор фильтровали (фильтр Millipore, 0,45 мкм), затем дегазировали под вакуумом.

Соотношение раствора А к раствору В составило 4:1.

Для подтверждения химической структуры метаболитов афобазола по синтезированным стандартам животным однократно внутривенно и внутрь вводили афобазол в дозе 25 мг/кг. Хроматографическая методика, методики количественного определения афобазола и его метаболитов в плазме крови и экскрементах крыс, а также обработка биологических проб, экстракция афобазола и его метаболитов из биологических образцов описаны в статье [3].

¹ Лаборатория фармакокинетики (руководитель — проф. В. П. Жердев) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

² Масс-спектрометрический анализ метаболитов афобазола проведен в Государственном научном центре по антибиотикам Министерства промышленности, науки и технологий РФ.

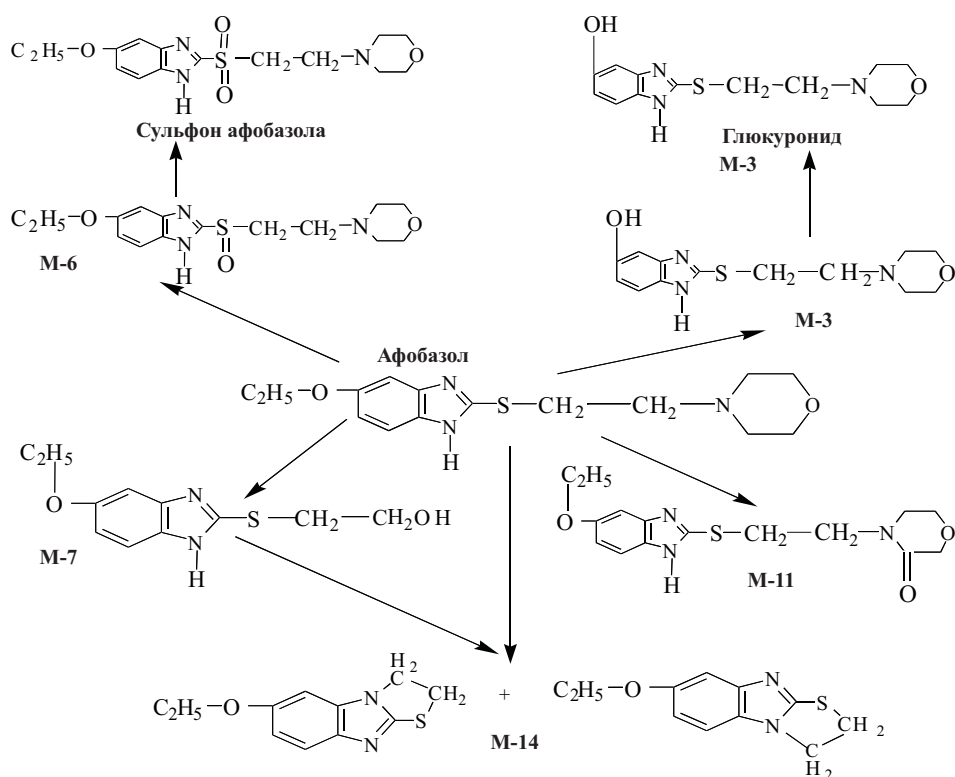


Схема биотрансформации афобазола на основании данных масс-спектрометрического анализа плазмы крови, мочи и кала крыс и встечного химического синтеза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование метаболизма афобазола с применением масс-спектрометрического анализа позволило обнаружить наряду с неизменным соединением 17 продуктов его биотрансформации. Метаболиты нумеровались в соответствии с возрастанием времени удерживания на аналитической колонке. В результате сравнительного анализа хроматографических и масс-спектральных свойств соединений 3, 6, 7, 11, 14 и синтезированных стандартов была установлена их полная идентичность. Другие метаболиты охарактеризованы по значениям молекулярных ионов [1]. В качестве основного идентифицирован метаболит — М-11.

На рисунке изображена схема биотрансформации афобазола, составленная на основе данных, полученных при определении афобазола и его биопродуктов в плазме крови, моче и кале крыс. Из приведенной схемы следует, что доминирующими метаболическими путями афобазола являются окислительные процессы.

На основании сравнительного анализа концентраций идентифицированных метаболитов установлено, что в наибольших количествах в плазме крови животных регистрируются метаболит М-3 (продукт гидролиза этокси группы бензольного кольца в 5 положении бензимидазольного цикла) и метаболит М-11 (продукт окисления 3-го атома углерода морфолинового кольца).

Метаболиты М-6 (продукт окисления гетероатома серы), М-7 (отщепление морфолинового фрагмента с последующим гидрокселированием алифатического

радикала) и М-14 (отщепление морфолинового фрагмента с последующей циклизацией) в плазме крови определялись в значительно меньших количествах. При этом образование метаболита М-14, являющегося смесью двух трициклических изомеров, можно рассматривать как результат процесса разрыва связи $\text{CH}_2\text{-N}$ с отщеплением морфолинового кольца и дальнейшей циклизацией по атомам азота. Второй путь — взаимодействие с молекулой H_2O — приводит к образованию оксиэтильного производного афобазола метаболита М-7. Возможность образования метаболита М-14 из М-7 не опровергается.

Таким образом, основные направления биотрансформации афобазола у крыс заключаются в образовании метаболитов — гидрокселированных по ароматическому кольцу бензимидазольного цикла и окисленных по морфолиновому кольцу. Реакции гидрокселирования бензимидазольного фрагмента подтверждаются литературными источниками по биотрансформации таких производных бензимидазола как ланзопразол, омепразол, пантопразол, альбендазол и др. [8 – 10].

В моче и кале животных, как показали проведенные исследования, основным метаболитом афобазола является М-3 (гидрокселированная форма по 5 положению бензимидазольного цикла). Кроме того, в моче крыс обнаружена глюкуроноконъюгированная форма метаболита М-3.

Следует отметить, что метаболит М-7, имеющий гидроксил в алифатическом радикале бензимидазоль-

ного цикла не образует глюкуроноконъюгаты. Количественное содержание М-7 в моче до гидролиза с β -глюкуронидазой и после гидролиза характеризовалось одними и теми же величинами.

В моче и кале крыс идентифицированы также метаболиты афобазола: М-6, М-7, М-11 и сульфид афобазола. По-видимому, метаболит М-6 (сульфоксид афобазола) подвергается вторичной необратимой реакции окисления, в результате которой образуется сульфид афобазола.

Из литературных источников известно, что реакции сульфоокисления и гидроксирования производных бензимидазола катализируются ферментами СУР3А4 и СУР2С19. На примере родственного по химической структуре афобазолу соединения омепразола было показано [5], что его основными обнаруживаемыми в плазме метаболитами являются гидрокси-омепазол и сульфид омепразола. При этом образование гидроксированной формы омепразола катализируется СУР2С19, тогда как в образовании сульфида вовлечен в основном СУР3А4. Скорее всего, в метаболизме афобазола принимают участие те же изоформы цитохромов.

Циклизированная форма метаболита М-7, присутствующая в плазме крови, в моче и кале крыс не обнаружена даже в следовых количествах.

Соединение М-11, являясь основным метаболитом в плазме крови крыс, определяется в моче в незначительных количествах. Скорее всего, это связано с его вторичной биотрансформацией в виде реакции гидроксирования по 5-му углеродному атому бензимидазольного цикла. На опытных хроматограммах регистрировались в значительных количествах дополнительные пики, отсутствовавшие в контроле. Возможно, один из таких пиков принадлежит гидроксированной форме метаболита М-11. Из литературных источников известно, что обнаруживаемые в плазме крови основные первичные метаболиты омепразола — 5-гидроксиомепазол и сульфид омепразола вторично биотрансформируются в гидроксисульфид [6]. Основным метаболитом альбендазола сульфид в дальнейшем превращается в два гидроксированных метаболита по алифатической цепи: 2-гидроксипропилсульфид и 3-гидроксипропилсульфид [7].

Таким образом, основные направления биотрансформации афобазола заключаются в образовании ме-

таболита М-11, а также конъюгированных и неконъюгированных форм метаболита М-3. Незначительная часть от введенной дозы препарата выводится в виде метаболитов М-6, М-7 и сульфида афобазола. Остальные метаболиты регистрируются в чрезвычайно малых количествах.

ВЫВОДЫ

1. На основании данных масс-спектрометрического анализа наряду с неизменным препаратом идентифицировано 17 продуктов его биотрансформации.

2. Встречным химическим синтезом подтверждены структуры 6 метаболитов афобазола: гидроксированного по бензимидазольному циклу, окисленного по гетероатому серы, гидроксированного по алифатическому радикалу, окисленного по морфолиновому фрагменту и циклизированного по атому азота.

3. Основными направлениями метаболизма афобазола являются гидроксирование по ароматическому кольцу бензимидазольного цикла и окисление по морфолиновому фрагменту.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Б. Кольванов, А. О. Виглинская, А. А. Литвин и др., *Тезисы 4-й международной конференции "Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам"*, Москва (2006), сс. 40 – 41.
2. Г. Г. Незнамов, С. А. Сюняков, Д. В. Чумаков и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, № 2, 15 – 19 (2001).
3. С. Б. Середенин, А. О. Виглинская, Г. Б. Кольванов и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **70**(2), 69 – 74 (2007).
4. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов и др., *Вестн. РАМН.*, № 11, 3 – 9 (1998).
5. A. Abelo, T. B. Andersson, U. Bredberg, et al., *Drug metabolism and disposition*, **28**(1), 58 – 64 (2000).
6. T. Andersson, J. O. Miners, M. E. Veronese, et al., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **37**(6), 597 – 604 (1994).
7. R. J. Gyurik, A. W. Chow, B. Zaber, et al., *Drug Metab. Dispos.*, **9**, 503 – 508 (1981).
8. R. Huber, B. Kohl, G. Sachs, et al., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **9**, 363 – 378 (1995).
9. M. D. Karol, G. R. Granneman, K. Alexander, *J. Chromatogr.*, **668**, 182 – 186 (1995).
10. R. E. Pearce, A. D. Rodrigues, J. A. Goldstein, and A. Parkinson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**, 805 – 816 (1996).
11. S. B. Seredenin, *Psihofarmakol. Biol. Narkol.*, **1** – 2(3), 494 – 509 (2003).

Поступила 23.11.07

AFOBAZOLE METABOLISM IN RATS

S. B. Seredenin, A. O. Viglinskaya, T. Ya. Mozhaeva, G. B. Kolyvanov, A. A. Litvin, N. I. Avdyunina, V. L. Savel'ev, and V. P. Zherdev

Laboratory of Pharmacokinetics, Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315, Russia;

Metabolism of afobazole in rats has been studied using mass-spectrometry and HPLC, which revealed 17 products of afobazole biotransformation along with the parent compound. The structures of six afobazole metabolites were established and confirmed by comparison of HPLC retention times with the synthetic reference compounds and HPLC/mass spectrometry. Other metabolites were characterized by the masses of molecular ions. A significant fraction of the drug dose is biotransformed with the formation of hydroxylated benzimidazole moiety and oxidated morpholine.