

ФАРМАКОКИНЕТИКА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ОКСИМА ПИНОСТРОБИНА

А. К. Сариев¹, Д. А. Абаимов¹, М. В. Танкевич¹, Д. И. Прохоров¹,
С. М. Адекенов², Л. И. Арыстан², Р. Д. Сейфулла¹

Проведено экспериментальное исследование путей элиминации оксимированного производного фитофлавоноида пиностробина с помощью метода жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Обнаружено четыре потенциальных метаболита оксима пиностробина и сделана попытка расшифровать их молекулярную структуру на основании характера их фрагментации при положительной ионизации электроспреем. Продемонстрировано, что препарат выводится преимущественно в неизменном виде, а также в виде глюкуронированного производного.

Ключевые слова: оксим пиностробина; флавоноиды; жидкостная хромато-масс-спектрометрия; метаболизм; глюкуронирование.

ВВЕДЕНИЕ

В Международном научно-производственном центре “Фитохимия” из почек тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.) выделено индивидуальное соединение, относящееся к флаванонам — пиностробин (5-гидрокси-7-метоксифлаванон). Следуя распространенному мнению о фармакологической активности флавоноидов, исследованиями Сейтембетовой А. Ж. и Кульмагамбетовой Э. А. методом инициированной биофлуоресценции для пиностробина был установлен потенциал антиоксидантной активности [3, 6]. Одним из путей получения новых соединений с физиологической активностью является реакция оксимирования, то есть получения химических производных — оксимов. Оксимы — это органические соединения, включающие в себя одну или несколько изонитрозогрупп $RR_1C=N-OH$. Среди веществ из группы оксимов есть немало фармакологически активных веществ. Некоторые из них уже являются зарегистрированными лекарственными препаратами. Сильным антиоксидантным действием обладает 2-пиридинальдоксиметиодид, который используется в качестве антидота при отравлениях фосфорорганическими инсектицидами. Аллоксим, диэтиксим, дипироксим, изонитрозин являются реактиваторами холинэстеразы [7, 14].

С целью получения новых производных и изучения их биологической активности в результате оксимирования пиностробина получен оксим пиностробина в

виде бесцветных ромбических кристаллов. Температура плавления 182 – 184 °С, молекулярная масса — 285,1. Конечный выход 84 %.

Прогнозирование биологической активности оксима пиностробина с помощью компьютерной системы PASS [13] позволило выявить спектр наиболее вероятных активностей (табл. 1) и сделать скрининг более целенаправленным.

Как видно из таблицы, наиболее вероятными видами биологической активности для оксима пиностробина являются мембраностабилизирующая и антиоксидантная. Опираясь на литературные данные, можно предположить, что это обусловлено способностью соединений флавоноидной природы связывать свободные радикалы и тем самым, влиять на процессы перекисного окисления липидов в клеточных мембранах [4]. Проведенные нами фармакологические исследования позволили установить наличие у оксима пиностробина гепатопротекторной [1], антиоксидантной [5, 6], гиполипидемической [2, 10], противовоспалительной [9] активности.

Целью настоящего исследования явилось изучение процессов биотрансформации оксима пиностробина (5-гидрокси-7-метокси-2-фенил-хромон-4-оксим) в эксперименте на животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты по биотрансформации оксима пиностробина выполнены на 24 белых беспородных крысах-самцах массой 220 ± 20 г (питомник лабораторных животных “Столбовая”, Московская область) в соответствии с “Правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ” (ГОСТ 3 51000.3 и 51000.4-96). Оксим пиностробина вводили однократно, внутривенно, в водных рас-

¹ ФГБУ “Научный центр неврологии” РАМН, Россия, лаборатория клинической фармакокинетики, зав. лабораторией — Р. Д. Сейфулла.

² Акционерное общество “Международный научно-производственный холдинг “Фитохимия”, Республика Казахстан.

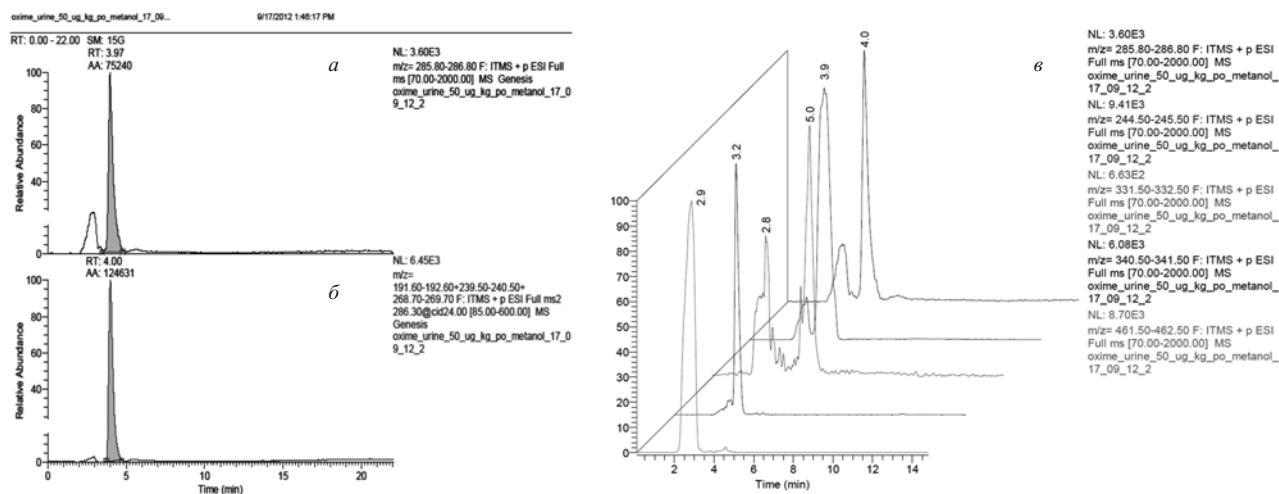


Рис. 1. Масс-хроматограммы MS¹ (а) и MS² (б) по иону с m/z 286 (энергия соударений 24). Пик с временем удерживания 4 мин — неизменный оксим пиностробина, содержащийся в моче крыс, получавших оксим пиностробина (50 мг/кг, внутрь). (в) Хроматограммы основных метаболитов оксима пиностробина, содержащихся в суточной моче крыс (50 мг/кг, внутрь).

творях с добавлением твина-80 (0,25 %) в дозе 50 мг/кг. Контрольным животным внутрижелудочно вводили 0,5 мл водного раствора твина-80. Возможные продукты метаболического превращения оксима пиностробина изучали в суточной моче крыс. Сбор суточной мочи проводили в метаболических камерах. Образцы хранили при температуре -18°C . В фармакокинетических экспериментах, проведенных ранее, в плазме крови крыс было обнаружено только неизменное вещество и не обнаружено продуктов его превращения. Поэтому настоящий материал полностью посвящен изучению процессов биотрансформации по содержанию оксима пиностробина и его метаболических продуктов в моче крыс.

С целью поиска оптимальных условий извлечения метаболитов из мочи лабораторных животных использованы различные методики экстракции и два авторских разработанных *de novo* масс-спектрометрических метода.

1. Обработка мочи простым разбавлением. К моче животных добавляли метанол в соотношении 1:1

(v:v). Образец центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин, после удаления механического осадка образец напрямую вводили в петлю инжектора хроматомасс-спектрометра в объеме 10 мкл.

2. Экстракция с применением кислого 0,1 М цитратного буфера (pH 5,0). К образцу мочи объемом 0,5 мл добавляли 1 мл буфера, перемешивали, после чего добавляли 6 мл этилацетата и встряхивали на вортекс-миксере Heidolph Multi Reax в течение 10 мин. Надосадочный органический слой декантировали, переносили в коническую пробирку и упаривали при 60°C в центрифужном вакуумном концентраторе Eppendorf 5301. Сухой остаток восстанавливали в 0,5 мл метанола и вкальывали в петлю инжектора хроматомасс-спектрометра в объеме 10 мкл.

3. Экстракция с применением нейтрального 0,2 М боратного буфера (pH 7,4). Процедура экстракции была аналогичной таковой для кислого буфера (pH 5,0).

Таблица 1. Спектр наиболее вероятных активностей оксима пиностробина (PASS)

Вид активности	Вероятность, %
Мембраностабилизирующая	90,3
Ангиопротекторная	80,4
Ингибирующая топоизомеразу 2	77,4
Заменитель сахара	71,2
Антиоксидантная	70,0
Антисеборейная	68,2
Аритмогенная	59,3
Ингибирующая ланостерол-14-альфа-деметилазу	58,9
Фибринолитическая	58,3
Ингибирующая ангиогенез	56,9

Таблица 2. Программа градиента

Время, мин	Раствор А, % (10 мМ ацетат аммония)	Раствор Б, % (ацетонитрил — 10 мМ ацетат аммония 90:10, v:v)
0	90	10
1	90	10
4	80	20
6	60	40
8	50	50
10	40	60
12	30	70
14	20	80
15	10	90
20	10	90
22	90	10

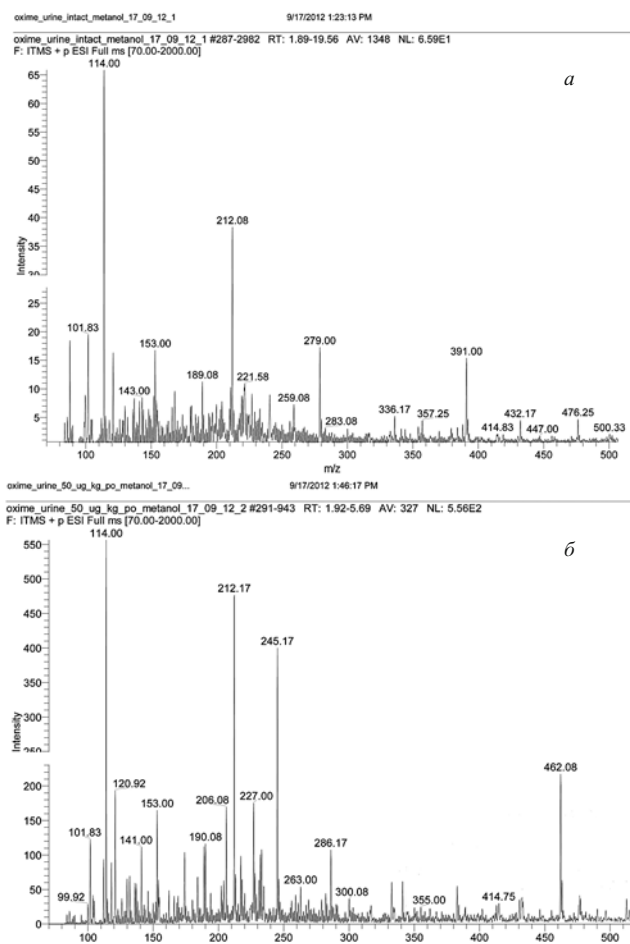


Рис. 2. Масс-спектрограмма первого порядка (MS^1) суточной интактной мочи (а); MS^1 суточной мочи крыс, получавших оксим пиностробина, 50 мг/кг, внутрь (б).

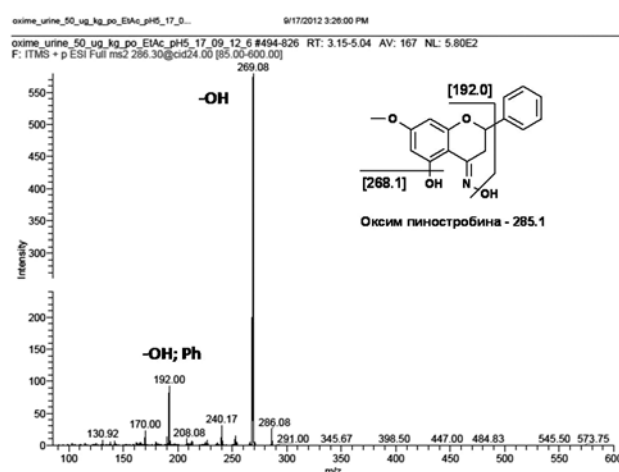


Рис. 3. Структура оксима пиностробина, пути его фрагментации и масс-спектр второго порядка.

4. Экстракция с применением 0,2 М боратного буфера (pH 9,0). Процедура экстракции была аналогичной таковой для кислого буфера (pH 5,0).

В результате анализа полученных образцов установлено, что наиболее эффективным способом пробоподготовки с максимальным извлечением метаболитов является экстракция с применением кислого буфера (pH 5,0).

Хроматомасс-спектрометрический анализ проводили на жидкостном хроматографе “Surveyor” производства “Thermo Fisher Scientific” (США), оснащенном насосом “Finnigan Surveyor LC Pump Plus”, автосамплером “Finnigan Surveyor AS Plus” с колоночным термостатом и масс-спектрометрическим детектором “LCQ Fleet MS” (квадрупольная ионная ловушка). Масс-спектрометр работал в режиме регистрации ио-

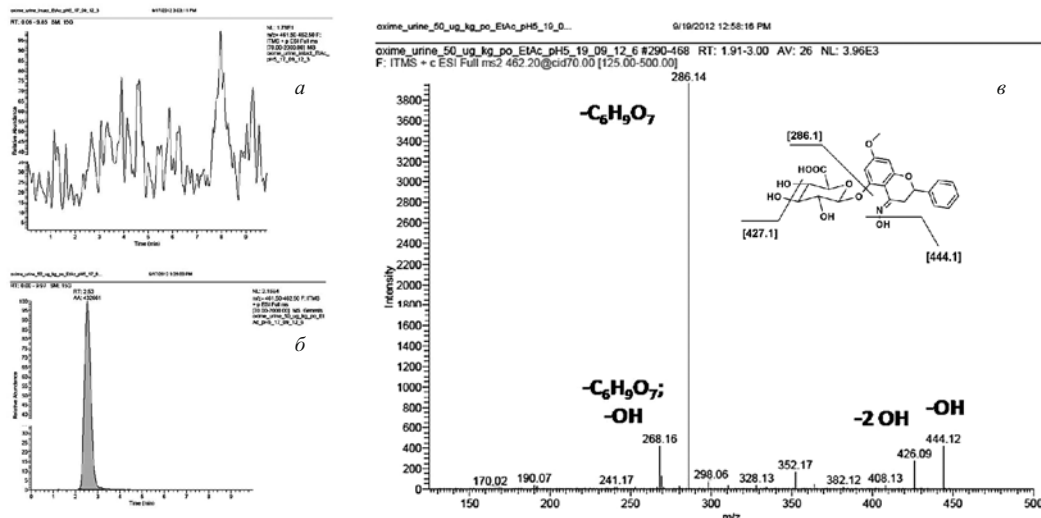


Рис. 4. Масс-хроматограммы по выбранному иону с m/z 462,2 (а) интактной суточной мочи и (б) суточной мочи крыс, получавших оксим пиностробина, 50 мг/кг, внутрь; (в) структура метаболита оксима пиностробина со значением m/z 462,2 (глюкуроновый конъюгат) и пути его дальнейшего распада на основании результатов масс-спектрометрии второго порядка (нормализованная энергия соударений — 70 эВ).

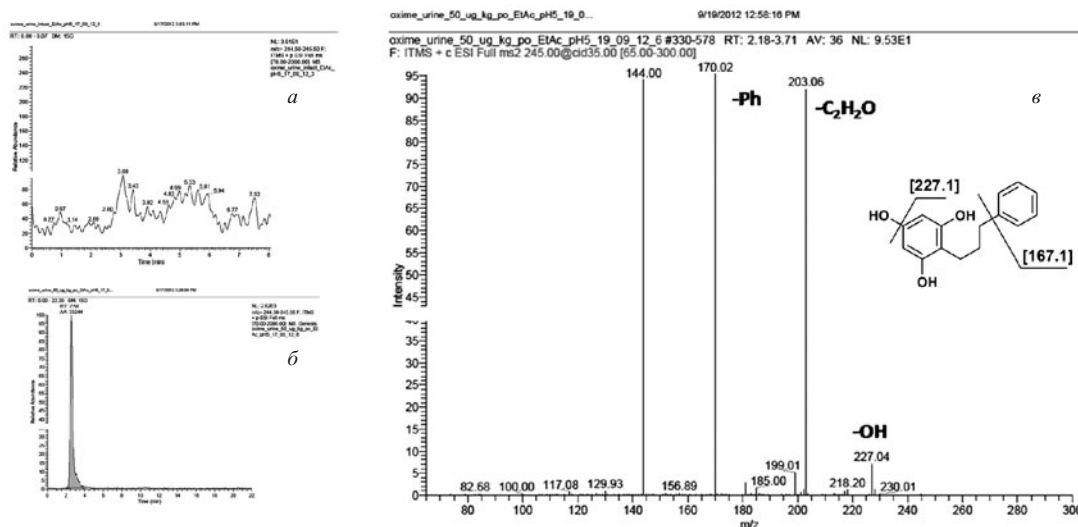


Рис. 5. Масс-хроматограммы по выбранному иону с m/z 245 (а) интактной суточной мочи и (б) суточной мочи крыс, получавших оксим пиностробина 50 мг/кг, внутрь; (в) масс-спектр второго порядка метаболита оксима пиностробина (m/z 245) при нормализованной энергии соударений 35 эВ и гипотетическая структура данного метаболита.

нов, положительно заряженных электроспреем (ESI), создаваемым напряжением в 5 кВ. Скорость потока газа-небулайзера (азота): 4 л/мин, давление на распылителе — 100 psi. Температура интерфейса капилляра составляла 350 °С, температура нагревателя — 300 °С. Амплитуда возбуждения на концевых электродах ловушки 0,1 В. В качестве демпфирующего газа в ионной ловушке использовался гелий. Данные обрабатывали с помощью программы Xcalibur 2.1 w/Foundation 1.0.1.

Для наиболее полного хроматографического разделения веществ, содержащихся в экстрактах мочи, был

разработан хроматомасс-спектрометрический метод с градиентным элюированием.

Разделение осуществляли на хроматографической колонке Hypersil Gold, 5 мкм, 4,6 × 100 мм, температура разделения 25 °С. Элюирование осуществляли в режиме градиента (табл. 2). Подвижная фаза состояла из двух растворов: 10 мМ ацетат аммония (раствор А) и ацетонитрил — 10 мМ ацетат аммония (90:10, v:v) (раствор Б).

Температура разделения 25 °С. Скорость потока подвижной фазы — 0,5 мл/мин. Объем пробы — 10 мкл. Время удерживания R_T оксима пиностробина составляло в среднем $3,9 \pm 0,1$ мин. Время анализа единичного образца составляло $22 \pm 0,5$ мин.

Масс-спектрометрический метод 1

Метод первичного скрининга. Сканирование масс MS^1 в широком диапазоне (70 – 2000 m/z). Одновременно регистрировали масс-спектр второго порядка по родительскому иону оксима пиностробина с m/z 286,1.

Масс-спектрометрический метод 2

После проведенного первичного поискового масс-спектрометрического исследования отобраны потенциальные ионы метаболитов. Разработан метод с одновременным сканированием MS^2 при нормализованной энергии соударений 35 эВ по следующим родительским ионам: m/z 245,0; 286,1; 332,1; 341,0; 462,2.

Количественный анализ проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения “Quan Browser” компании “Thermo Fisher Scientific”. Калибровочную кривую получали в результате анализа проб с добавками известных количеств стандарта определяемого соединения. Для построения калибровочной кривой и расчета процента извлечения

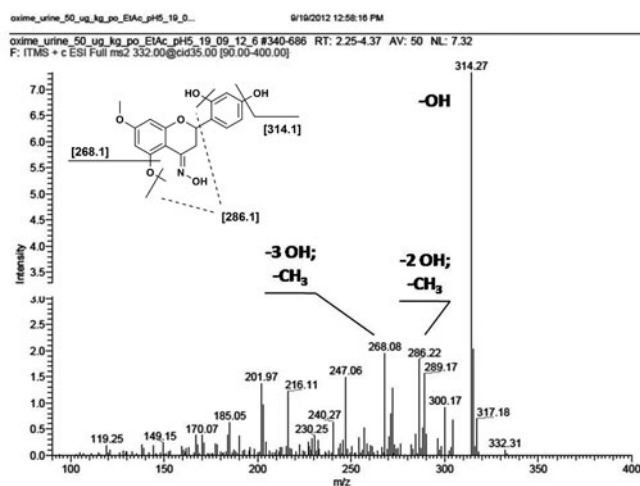


Рис. 6. MS^2 суточной мочи крыс, получавших оксим пиностробина в количестве 50 мг/кг, по m/z 332 (экстракция этилацетатом при pH 5,0) и предполагаемая структура метаболита оксима пиностробина со значением m/z 332, и пути его дальнейшего распада на основании результатов масс-спектрометрического анализа второго порядка.

анализируемого соединения из биоматериала готовили рабочий стандартный раствор оксима пиностробина в метаноле — 1 мг/мл. Из него далее методом последовательных разведений готовили серию стандартных растворов оксима пиностробина в метаноле с концентрациями 5; 2,50; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 и 0,078 мкг/мл. Модельные растворы оксима пиностробина в моче (для построения внутренней калибровочной кривой) готовили в аналогичных концентрациях.

Калибровочная зависимость была линейной в изучаемом диапазоне концентраций. График описывался линейным уравнением:

$$Y = 15559,6 \cdot X,$$

где Y — площадь пика в условных единицах интегрирования; X — концентрация оксима пиностробина, мкг/мл. Концентрация оксима пиностробина рассчитывалась по формуле:

$$C_{\text{oxime}} = 6,43 \cdot 10^{-5} \cdot S,$$

где C_{oxime} — концентрация оксима пиностробина (мкг/мл); S — площадь пика в условных единицах интегрирования. Коэффициент корреляции составил 0,9982, что соответствует удовлетворительной аппроксимации [8]. Предел количественного обнаружения без предварительного концентрирования — 0,078 мкг/мл. Для определения меньших концентраций применяли метод концентрирования — объем мочи увеличивали до 1 мл, сухой остаток перерастворили в 100 мкл метанола. Содержание оксима пиностробина в анализируемых образцах определяли по формуле:

$$C_x = \frac{C \cdot V_1}{V_2},$$

где C — концентрация вещества, найденная по калибровочной кривой; V_1 — объем растворителя сухого остатка; V_2 — объем мочи, взятый для анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований биотрансформации оксима в суточной моче крыс обнаружены как неизменное вещество с временем удерживания 4,0 мин (рис. 1, а, б), так и 4 его основных метаболита со значениями времени удерживания от 3,10 до 4,77 мин (рис. 1, в). В рамках отдельного эксперимента по определению содержания неизменного оксима пиностробина в суточной моче крыс получены результаты, позволяющие сделать вывод о том, что исходное соединение определяется в суточной моче в количестве $2,24 \pm 0,30$ % от введенной дозы.

На рис. 2, а представлен суммарный масс-спектр интактной мочи крыс, на рис. 2, б — масс-спектр суточной мочи крыс, получавших оксим пиностробина в дозе 50 мг/кг. После сравнения масс-спектров интакт-

ной мочи и мочи крыс, получавших оксим пиностробина в количестве 50 мг/кг, выделили 4 его потенциальных метаболита со значениями m/z 245; 332; 341 и 462.

Далее провели интерпретацию масс-спектрограмм второго порядка основных метаболитов для выявления их структуры. Исходя из структуры самого оксима пиностробина и путей его фрагментации (рис. 3) сделаны предположения о возможной структуре его метаболитов.

1. Глюкуроноконъюгированный оксим пиностробина

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что наиболее значимым метаболитом является глюкуроноконъюгат оксима пиностробина с m/z 462,2 и временем удерживания 2,53 мин. Согласно правилам интерпретации масс-спектров метаболитов лекарственных веществ, описанных Korfmacher и соавторами, глюкуроноконъюгированному метаболиту на масс-спектрограмме соответствует ион, отличающийся от иона неизменного вещества на 176,03 а.е.м [12]. Действительно, если из m/z 462,2 вычесть 176, то мы получим массу, соответствующую m/z оксима пиностробина — 286,2. Площадь пика глюкуроноконъюгированного производного оксима пиностробина на порядок больше площадей пиков прочих метаболитов, что позволяет говорить о глюкуронировании, как о главном пути метаболизма оксима пиностробина.

Из рис. 4, а и б видно, что пик, соответствующий иону со значением m/z 462,2, отсутствует в образце интактной мочи. Для изучения структуры метаболита оксима пиностробина с m/z 462,2 был снят его масс-спектр второго порядка. Действительно, подтверждением нашего предположения о том, что пик с m/z 462,2 — это именно глюкуронид оксима пиностробина, служит картина масс-спектра второго порядка для данного вещества, на котором мы можем видеть пик фрагментарного иона с m/z 286,1, соответствующий по m/z иону оксима пиностробина (рис. 4, в).

Материалы рис. 4, в позволяют предположить следующую фрагментацию соединения: m/z 444,1 — $[M + H-OH]$; m/z 427,1 — $[M + H-2OH]$; m/z 286,1 — $[M + H-C_6H_9O_7-OH]$.

2. Метаболит оксима пиностробина, содержащий фрагмент гидрокоричной кислоты

Из рис. 5, а и б видно, что пик, соответствующий иону со значением m/z 245, отсутствует в образце интактной мочи. Данному метаболиту может соответствовать соединение, изображенное на рис. 5, в. Материалы рис. 5 позволяют предположить следующую фрагментацию соединения: m/z 227,1 — $[M + H-OH]$; m/z 203,1 — $[M + H-C_2H_2O]$; m/z 107,0 — $[M + H-Ph]$. Из литературных данных известно, что флавоноиды подвергаются в кишечнике биodeградации под действием кишечной микрофлоры. Основные процессы на этом этапе — деструкция бензольных ядер в аглико-

нах с образованием в качестве метаболитов различных гидроксид- и метоксипроизводных ароматических кислот — фенилпропионовой и коричной, которые экскретируются с мочой [11]. В этой связи наиболее вероятной структурой метаболита с m/z 245 предположительно является структура молекулы, изображенная на рис. 5, в (содержит характерный фрагмент фенилпропионовой кислоты).

3. Минорные метаболиты (m/z 332, 341)

Из рис. 2 видно, что пик, соответствующий иону со значением m/z 332, отсутствует в образце интактной мочи. Исходя из данных масс-спектрометрии второго порядка, можно сделать предположение, что иону со значением m/z 332 соответствует соединение, изображенное на рис. 6, образующееся в результате метилирования и двойного гидроксирования. Причем при отщеплении от него одной гидроксильной группы образуется соединение, соответствующее иону со значением m/z 314,1, а при отщеплении двух гидроксильных групп и одной метильной получается молекула исходного соединения с m/z 286 (рис. 6).

На рис. 2, а (в образце интактной мочи) также отсутствует пик, соответствующий иону со значением m/z 341. Предположительно соединение, соответствующее иону со значением m/z 341, может быть продуктом комбинации целого ряда ферментативных реакций, таких как окислительное дезаминирование, ацетилирование, гидроксирование и эпоксирирование оксима пиностробина. Однако смоделировать корректную структуру данного соединения исключительно на основании масс-спектрограмм, как первого, так и второго порядка, не представляется возможным. Для выяснения структуры данного метаболита требуется проведение дальнейших исследований с привлечением методов встречного синтеза и ЯМР-спектроскопии.

ВЫВОДЫ

1. Оксим пиностробина выводится из организма животных преимущественно в неизменном виде.

2. Вторым по значимости путем элиминации оксима пиностробина является выведение его в виде глюкуроноконъюгата.

3. Третьим по значимости метаболитом является интермедиат, содержащий остаток фенилпропионовой кислоты.

4. В образцах мочи также обнаружены минорные метаболиты, которые предположительно образуются в результате таких ферментативных реакций, как гидроксирование, метилирование и эпоксирирование.

5. Для более точного изучения процессов биотрансформации оксима пиностробина необходимо провести встречный синтез его предполагаемых метаболитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. И. Арыстан, Б. И. Тулеуов, *Здоровье и болезнь*, 6, 12 – 14 (2010).
2. Л. И. Арыстан, С. М. Адекенов, Н. М. Жанбасинова, *Фармац. бюл.*, 1(2), 56 – 58 (2010).
3. Э. А. Кульмагамбетова, *Флавоноиды Artemisia, Populus, Sal-solla, их химическая модификация и биологическая активность*, Караганда (2001).
4. А. Н. Осипов, Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, *Успехи биол. химии*, 31, 180 – 208 (1990).
5. Е. А. Роднова, В. В. Иванов, В. С. Чучалин и др., *Бюл. сиб. мед.*, 5, 95 – 100 (2011).
6. А. Ж. Сейтембаева, С. М. Адекенов, *Природные фенольные соединения — перспективный источник антиоксидантов*, КазГосИНТИ, Алматы (2001).
7. В. Г. Скребицкий, Н. А. Капай, В. И. Деревягин, Р. В. Кондратенко, *Анналы эксперим. и клин. неврол.*, 2(2), 23 – 28 (2008).
8. К. С. Сычёв, *Практическое руководство по жидкостной хроматографии*, Москва (2010).
9. М. М. Тусупбекова, Л. И. Арыстан, З. Т. Шульгау, *Мед. и экол.*, 3(60), 78 – 82 (2011).
10. З. Т. Шульгау, Л. И. Арыстан, А. А. Каримова, Н. М. Жанбасинова, *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции*, Пятигорск (2010), сс. 431 – 433.
11. К. Е. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya, *J. Nutr. Biochem.*, 57(8), 3342 – 3357 (2002).
12. W. A. Korfmacher, *Using Mass-Spectrometry for Drug Metabolism Studies*, Taylor and Francis, New-York (2010).
13. V. Poroikov, D. Filimonov, *Rational Approaches to Drug Design*, 16(11), 403 – 407 (2001).
14. Y. Yang, Y. Jung., K. A. Oh, N. J. Park, *Bioorgan. Med. Chem.*, 15(24), 7704 – 7710 (2007).

Поступила 23.07.14

EXPERIMENTAL STUDY OF PINOSTROBINE OXIME BIOTRANSFORMATION

A. K. Sariev¹, D. A. Abaimov¹, M. V. Tankevich¹, D. I. Prokhorov¹, S. M. Adekenov², L. I. Arystan², and R. D. Seyfulla¹

¹ Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Volokolamskoe Shosse 80, Moscow, 125367 Russia;

² “Phytochemistry” International Research and Production Holding, Karaganda, 100009 Republic of Kazakhstan

We have experimentally studied pathways of elimination of an oximized derivative of phytoflavonoid pinostrobine by HPLC/mass spectrometry. Four potential metabolites of pinostrobine oxime have been found and there was an attempt to determine their molecular structures on the basis of their fragmentation under positive electrospray ionization conditions. It is established that pinostrobine oxime is removed from the organism mainly unchanged and also in the form of glucuronated derivative.

Keywords: pinostrobine oxime; flavonoids; liquid chromatography/tandem mass spectrometry; metabolism; glucuronidation