

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА ГИСТОХРОМА В МОЧЕ КАК ЭТАП В ИЗУЧЕНИИ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ПРЕПАРАТА

О. С. Талалаева¹, Н. П. Мищенко², В. М. Брюханов¹, Я. Ф. Зверев¹, В. В. Лампатов¹, Л. Г. Дворникова³

Гистохром — лекарственная форма эхинохрома (2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон). Выявленная в предыдущих исследованиях связь фармакодинамики препарата с метаболизмом, предопределила цель исследования — изучить экскрецию эхинохрома и его возможных метаболитов почками крыс. Гистохром вводили подкожно (10 мг/кг) крысам Вистар. Производные нафтохинона экстрагировали из подкисленной мочи этилацетатом и анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием и масс-спектрометрическим детектором. Установлено, что гистохром полностью метаболизируется в организме и экскретируется почками в виде 3-метокси-2,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона и 2-метокси-3,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона.

Ключевые слова: гистохром; эхинохром; метаболизм; экскреция

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные препараты серии Гистохром созданы на основе морского природного соединения эхинохрома А (2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон), хиноидного пигмента морских беспозвоночных [2 – 4]. Опыт применения гистохрома в практической медицине и последние экспериментальные исследования показали, что наряду с антиоксидантным действием, эхинохром обладает другими видами фармакологической активности [1, 5 – 7]. Вместе с тем фармакокинетика препарата остается мало изученной. Вопросы, где и каким образом метаболизируется гистохром, представляют большой интерес еще и потому, что в последнее время появляются данные, указывающие на наличие у эхинохрома свойств пролекарства. Было показано, что обнаруженный диуретический эффект гистохрома у крыс [1] нивелируется на фоне применения хлорамфеникола [8] известного ингибитора процесса микросомального окисления. Это позволяет предположить, что гистохром проявляет свойства пролекарства, а фармакологической активностью обладают продукты его метаболизма.

Целью исследования явилось изучение экскреции 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона и его возможных метаболитов почками крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах применяли препарат “Гистохром, раствор для внутривенного введения 1 %” (Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток). Для идентификации наиболее вероятных метаболитов эхинохрома А использовали стандартные образцы 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона, 3-метокси-2,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона и 2-метокси-3,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона, полученные синтетическим путем в лаборатории Тихоокеанского института биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН.

Изучение экскреции гистохрома почками проводили на аутбредных крысах-самцах Вистар массой 180 – 220 г ($n = 10$), которые находились в индивидуальных клетках, приспособленных для сбора мочи, в условиях стандартной диеты. Эксперименты выполняли с соблюдением требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.).

Гистохром вводили животным подкожно (10 мг/кг) на протяжении 10 сут. В течение последующих суток после отмены препарата у животных собирали мочу и подкисляли ее раствором соляной кислоты (рН 2,0). Затем с помощью этилацетата экстрагировали производные нафтохинона. Экстракцию осуществляли в делительной воронке тремя порциями растворителя. Полученный объединенный этилацетатный экстракт упаривали под вакуумом водоструйного насоса при температуре 45 °С до общего объема 20 мл. После добавления равного объема спирта этилового (50 %) полученную смесь повторно упаривали на ротаторном испарителе ИР-1-ЛТ до водного остатка, который подвергали сушке в вакуумном сушильном шкафу марки ШСВ (50 °С).

¹ Кафедра фармакологии (руководитель — проф. В. М. Брюханов), ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет МЗ РФ, 656038, Барнаул, пр-т Ленина, 40.

² Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН, 690022, Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, 15.

³ Кафедра фармацевтической технологии (руководитель — проф. В. Ф. Турецкова), ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет МЗ РФ, 656038, Барнаул, пер. Некрасова, 65.

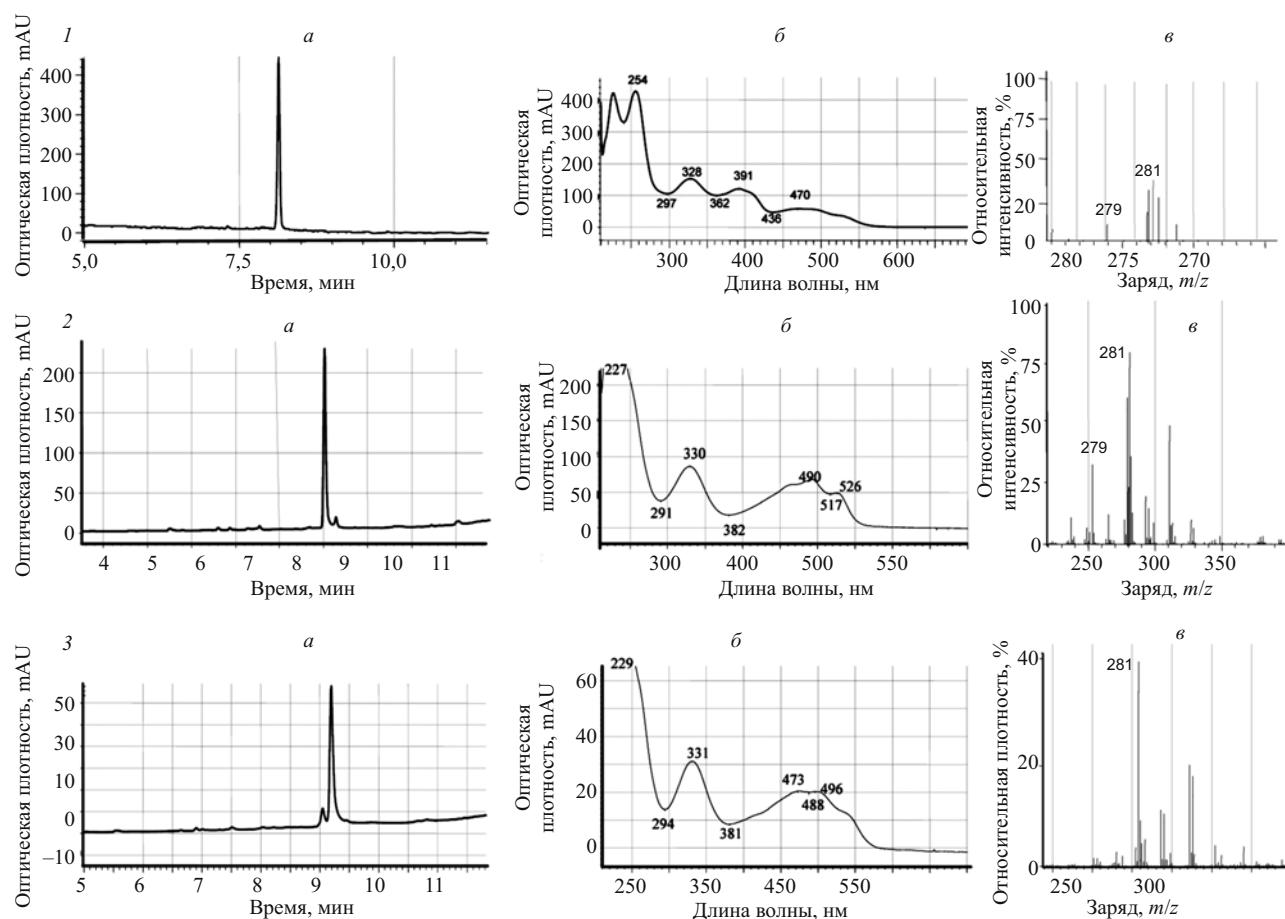


Рис. 1. Исследуемые показатели стандартных образцов 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона (1), 3-метокси-2,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона (2) и 2-метокси-3,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона (3): а — ВЭЖХ-хроматограмма; б — УФ-спектр; в — масс-спектр в режиме положительной ионизации, $[M]^+ m/z$.

Сухой остаток этилацетатного экстракта мочи подопытных крыс и стандартные образцы 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона, 3-метокси-2,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона и 2-метокси-3,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона разводили 50 % этанолом в соотношении 1:3. После центрифугирования на высокоскоростной центрифуге в течение 15 мин при 7000 об/мин пробы подвергали анализу на высокоэффективном хроматографе Shimadzu LCMS-2020 (Kyoto, Япония) с УФ-детектированием на диодной матрице (ВЭЖХ-УФ-ДМД) и масс-спектрометрическим детектором (МС). Деление проводили на колонке Shim-pack XR-ODS (длина 75 мм, внутренний диаметр 3,0 мм, размер частиц 2,2 мкм), температура колонки 40 °С, длина волны 254 нм, скорость потока 0,3 мл/мин. Растворитель А — вода, растворитель Б — ацетонитрил, содержащий 0,1 % уксусной кислоты. Линейные градиенты по растворителю Б: 20 – 100 % в течение 10 мин, 100 % в течение 2 мин, 100 – 20 % в течение 2 мин, восстановление колонки в течение 2 мин.

Масс-спектры регистрировали методом ионизации электроспрей (ионизация распылением в электрическом поле). Спектры регистрировали в режиме поло-

жительной $[M]^+$ и отрицательной $[M]^-$ ионизации в диапазоне 60 – 600 m/z . Напряжение интерфейса 4,5 kV, 1,4 kV(+), 1,65 kV(–). Скорость потока азота 1,5 л/мин.

Идентификацию выделенных соединений проводили по параметрам удерживания, оптического поглощения в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях и масс-спектру. Обработку первичных данных и расчеты проводили в среде программы GCMS solution.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматографический анализ 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона показал, что время удерживания этого соединения составляет $T_R = 8,2$ мин (рис. 1, 1). Из того же рисунка видно, что для УФ-спектра эхинохрома А характерны четыре максимума поглощения: λ 254, 328, 391, 470 нм. В масс-спектре 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона зарегистрирован пик иона при $[M]^+ m/z = 267$ и $[M]^- m/z = 265$.

Изучение стандартных образцов 3-метокси-2,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона и 2-метокси-3,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона методом

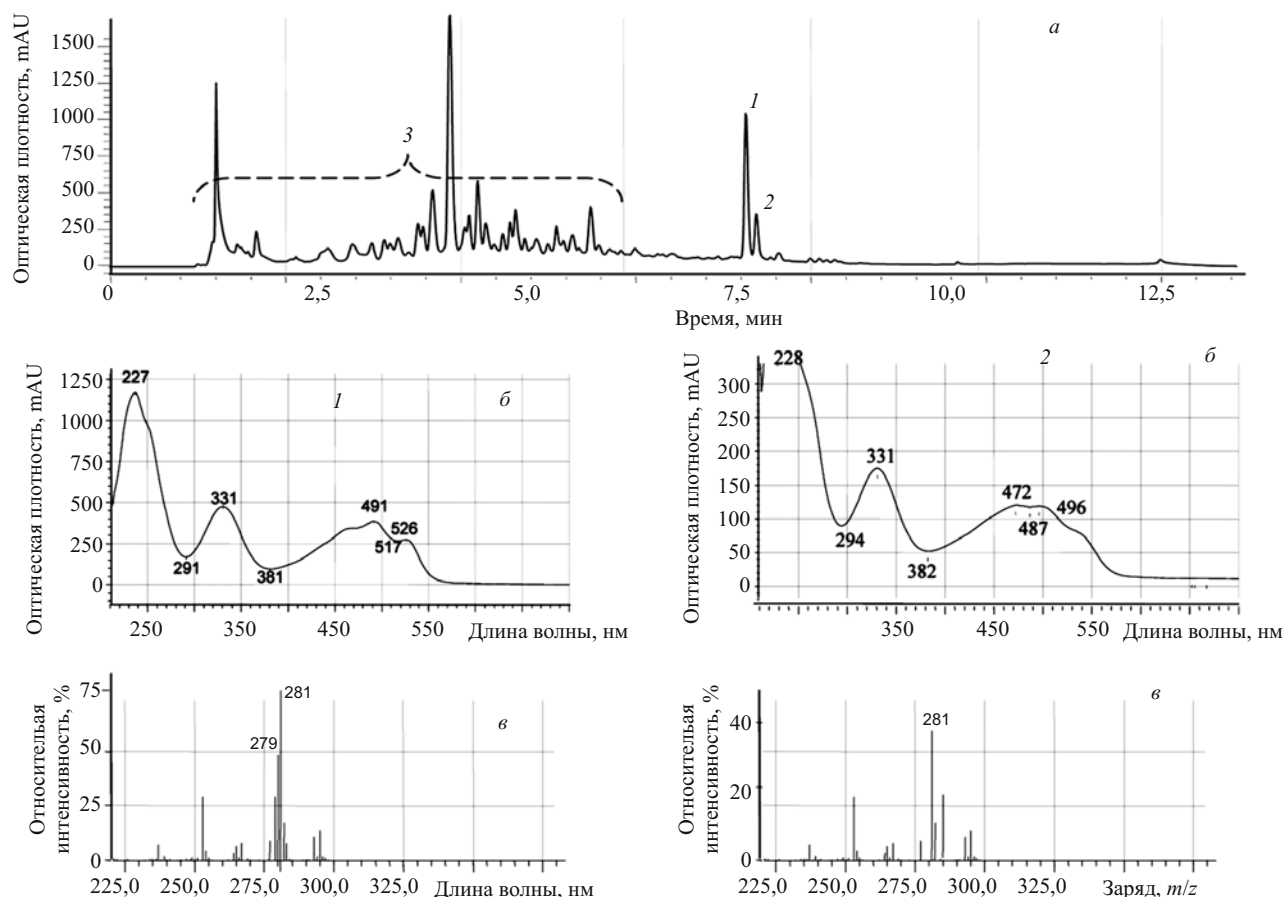


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограмма (а) этилацетатного экстракта мочи крыс и УФ-спектры (б) и масс-спектры (в) соединений выделенных 1 и 2, 3 — неизвестные соединения.

ВЭЖХ показало, что время удерживания соединений составляет $T_R = 9,0$ мин и $T_R = 9,2$ мин, соответственно (рис. 1, 2). При этом спектроскопия оптического поглощения 3-орто-метилового эфира эхинохрома в ультрафиолетовой области зафиксировала четыре максимума поглощения: λ 227, 330, 490 и 526. Для УФ-спектра 2-орто-метилового эфира эхинохрома также типична измененная нафтохиноновая структура с четырьмя максимумами поглощения: λ 229, 331, 473 и 496 нм. В масс-спектрах, как 3-метокси-2,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона, так и 2-метокси-3,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона, имеется интенсивный пик при $m/z = 281$ $[M]^+$ и $m/z = 279$ $[M]^-$.

При хроматографическом анализе этилацетатного экстракта из мочи крыс методом ВЭЖХ пик, соответствующий 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинону ($T_R = 8,2$ мин), не выявлен. Вместе с тем на той же хроматограмме в пределах обнаружения эхинохрома А зарегистрированы два ярко-выраженных сопряженных пика соединений 1 и 2 со временем удерживания $T_R = 9,0$ мин и $T_R = 9,2$ мин, соответственно (рис. 2). Методом УФ-спектроскопии установлено, что соединение 1 имеет четыре максимума поглощения: λ 227, 331, 491 и 526. УФ-спектр соединения 2 характеризовался спектральными максимумами в диапазонах

λ 228, 331, 472 и 496 нм. МС-детектирование показало, что обоим соединениям отвечает основной пик при $m/z = 281$ $[M]^+$ и $m/z = 279$ $[M]^-$.

Скрининговый анализ УФ и масс-спектров суммы пиков из области, обозначенной цифрой 3, не выявил соединений с нафтазириновой структурой.

Методами ВЭЖХ-УФ-ДМД и МС-спектрометрии установлено, что гистохром полностью метаболизируется в организме и экскретируется почками в виде производных 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона. Одним из доказательств этого утверждения является отсутствие пика на ВЭЖХ-хроматограмме, характерным для эхинохрома А временем удерживания ($T_R = 8,2$, рис. 2). Вместе с тем из того же рисунка видно, что в пределах обнаружения 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона зарегистрированы два сопряженных пика соединений 1 и 2. При этом максимальная выраженность выявленных пиков указывает на высокую концентрацию этих веществ в моче крыс. Здесь же отметим, что присущий соединению 1 пик преобладает над таковым у 2-го вещества.

Дальнейший анализ полученных результатов показал, что время удерживания обнаруженных в моче крыс соединений 1 и 2 совпадает с таковым у 3-метокси-2,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона ($T_R = 9$ мин)

и 2-метокси-3,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона ($T_R = 9,2$ мин), соответственно. Более того, оказалось, что УФ-спектры веществ 1 и 2 идентичны спектральными характеристиками стандартных образцов метилового эфира эхинохрома А. Масс-спектрометрическим анализом установлено, что обнаруженным в моче крыс соединениям 1 и 2 и стандартным образцам 3- и 2-орто-метилового эфира эхинохрома отвечает основной пик при $m/z = 281$ [M]⁺. Таким образом, не вызывает сомнений, что молекулярные массы описываемых соединений полностью совпадают.

Закономерно, что скрининговый анализ УФ и масс-спектров суммы пиков "3" не выявил соединений с нафтазариновой структурой. Известный порядок выхода веществ на хроматограмме позволяет утверждать, что сумма пиков "3" обусловлена низкомолекулярными, высокогидрофильными соединениями, среди которых наличие метаболитов гистохрома маловероятно. Известно, что нафтазариновое кольцо эхинохрома представляет очень прочную химическую структуру, разрушение которой в условиях организма не происходит, а любые возможные модификации *in vivo* этого соединения связаны с заместителями в нафтазариновом кольце. Это означает, что метаболиты эхинохрома А, имея нафтазариновую структуру, будут иметь время выхода, близкое к нативному соединению. По-видимому, идентифицированные пики 1 и 2 являются основными метаболитами 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона.

Обобщая полученные данные, можно предположить, что основной путь биотрансформации гистохрома заключается в метилировании гидроксигрупп 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона в 3- и 2-ортоположениях. При этом основными метаболитами эхинохрома являются 3-метокси-2,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинон и 2-метокси-3,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинон. Ранее в исследованиях установлено, что характерное для длительного введения гистохрома 5-кратное увеличение диуреза, нивелировалось на фоне применения хлорамфеникола [8].

Учитывая, что последний является мощным ингибитором микросомального окисления в печени, было выдвинуто предположение, что ослабление экскреторной функции почек в этих условиях связано с угнетением метаболизма эхинохрома, а мочегонный эффект препарата обусловлен не столько нативным соединением, сколько продуктами его метаболизма. Интегрируя приведенные данные и результаты настоящего исследования, можно предположить, что идентифицированные метаболиты эхинохрома определяют выявленное ранее диуретическое действие гистохрома.

ВЫВОД

Гистохром подвергается биотрансформации в организме и экскретируется почками в виде 3-метокси-2,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона и 2-метокси-3,5,6,8-тетрагидрокси-7-этилнафтохинона, которые, по-видимому, определяют фармакологическую активность препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Лампатов, А. Ю. Жариков, С. А. Федорев и др. Пат. № 2408367 РФ (2011). Диуретическое средство.
2. Г. Б. Еляков, О. Б. Максимов, Н. П. Мищенко и др. Пат. № 2137472 РФ (1999); *Лекарственный препарат "Гистохром" для лечения острого инфаркта миокарда и ишемической болезни сердца.*
3. Г. Б. Еляков, О. Б. Максимов, Н. П. Мищенко и др. Пат. № 2134107 РФ (1999); *Препарат "Гистохром" для лечения воспалительных заболеваний сетчатки и роговицы глаз.*
4. Н. П. Мищенко, С. А. Федорев, Л. П. Догадова, *Вестн. ДВО РАН*, № 3, 111 – 119 (2004).
5. О. С. Талалаева, А. Ю. Жариков, С. А. Федорев и др., *Бюллетень сибирской медицины*, № 5, 101 – 104 (2011).
6. О. С. Талалаева, *Вестн. уральской медицинской академической науки*, 3(1), 48 (2011).
7. О. С. Талалаева, Н. П. Мищенко, В. М. Брюханов и др., *Бюл. СО РАМН*, 32(4), 28 – 31 (2012).
8. О. С. Талалаева, А. Ю. Жариков, Я. Ф. Зверев и др., *Бюл. сибирской медицины*, 12(3), 69 – 75 (2013).

Поступила 01.02.14

IDENTIFICATION OF HISTOCHROME METABOLISM PRODUCTS IN URINE FOR STUDYING DRUG PHARMACOKINETICS

O. S. Talalaeva¹, N. P. Mishchenko², V. M. Bryukhanov¹, Ya. F. Zverev¹, V. V. Lampatov¹, and L. G. Dvornikova³

¹ Pharmacology Chair, Altai State Medical University, pr. Lenina 40, Barnaul, Altai Krai, 656038, Russia

² Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, pr. Stoletiya Vladivostoka 15, Vladivostok, 690022, Russia

³ Pharmaceutical Technology Chair, Altai State Medical University, per. Nekrasova 65, Barnaul, Altai Krai, 656038, Russia

Histochrome is the medicinal form of echinochrome (2,3,5,6,8-pentahydroxy-7-ethyl-1,4-naphthoquinone). The drug pharmacodynamics and its relationship with metabolism, which was revealed in previous investigations, predetermined the aim of this work: to study excretion of echinochrome and its possible metabolites in urine of rats. Histochrome was introduced to Wistar rats ($n = 10$) subcutaneously in a dose of 10 mg/kg. Naphthoquinone derivatives were extracted from the acidified urine by ethyl acetate and analyzed by high performance liquid chromatography with UV detection (HPLC/UV) and mass-spectrometric detection (HPLC/MS). It was established that histochrome is completely metabolized in an organism and excreted by kidneys in the form of 3-methoxy-2,5,6,8-tetrahydroxy-7-ethyl-1,4-naphthoquinone and 2-methoxy-3,5,6,8-tetrahydroxy-7-ethyl-1,4-naphthoquinone.

Keywords: histochrome; echinochrome; metabolism; excretion