

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2010

С. А. Апполонова<sup>1</sup>, В. Г. Валиев<sup>2, 3</sup>, М. А. Дикунец<sup>1</sup>, А. В. Кухаренко<sup>3</sup>,  
Г. М. Родченков<sup>1</sup>, Е. М. Зелтынь<sup>2</sup>, А. Б. Безпрозванный<sup>3</sup>, В. А. Горшков<sup>2</sup>,  
А. Э. Радзевич<sup>2</sup>

## ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА И ФАРМАКОКИНЕТИКИ НИБЕНТАНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup> ФГУП "Антидопинговый центр", Москва, Россия; appolonova@dopingcontrol.ru

<sup>2</sup> Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва, Россия;

<sup>3</sup> Государственная клиническая больница № 52, Москва, Россия

Представлен метод определения метаболитов нибентана в плазме человека методом ВЭЖХ-МС. После однократного внутривенного введения нибентана (0,125 мг/кг) в плазме человека были найдены неизменный нибентан и 3 его метаболита — гидроксिलированный, дезэтилированный и дезэтилгидроксильированный. Наиболее долгоживущим метаболитом нибентана является дезэтилированный. Дезэтилированный и дезэтилгидроксильированный метаболиты найдены в плазме человека впервые. Структуры найденных метаболитов устанавливали с помощью МС и МС-МС масс-спектров. Также в данной работе проведены фармакокинетические исследования нибентана.

**Ключевые слова:** нибентан, метаболизм, фармакокинетики, ВЭЖХ-МС

Нибентан (N-[5-(диэтиламино)-1-фенилпентил]-4-нитробензамид) — оригинальный отечественный антиаритмический препарат III класса (по классификации Vaughan Williams). Первые данные о влиянии нибентана на сердце описаны в [1]. В дальнейшем экспериментальные исследования проводились в лаборатории электрофизиологии сердца Института экспериментальной кардиологии РКНПКМЗ РФ, а клинические испытания были выполнены в отделах неотложной кардиологии и клинической электрофизиологии Института кардиологии им. А. Л. Мясникова РКНПК МЗ РФ [2].

Данные по изучению метаболизма нибентана [3] и его фармакокинетики [4] представлены только в 2 работах, исследования проводились на крысах. В работе [3] было показано, что основным из метаболитов нибентана в моче крыс является 4-гидроксинибентан. Фармакокинетические данные крови крыс [4] при внутривенном введении 5 мг/кг нибентана показали, что нибентан очень быстро распределяется по органам и тканям.

Целью настоящей работы было определение метаболитов нибентана в плазме человека методом ВЭЖХ-МС и изучение фармакокинетики нибентана при внутривенном введении препарата пациентам, страдающим коронарными заболеваниями.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: 1) оптимизировать условия хроматографического разделения, пробоподготовки образцов плазмы крови человека и разработать ВЭЖХ-МС метод определения нибентана и его

метаболитов в плазме крови человека; 2) получить значения основных фармакокинетических параметров.

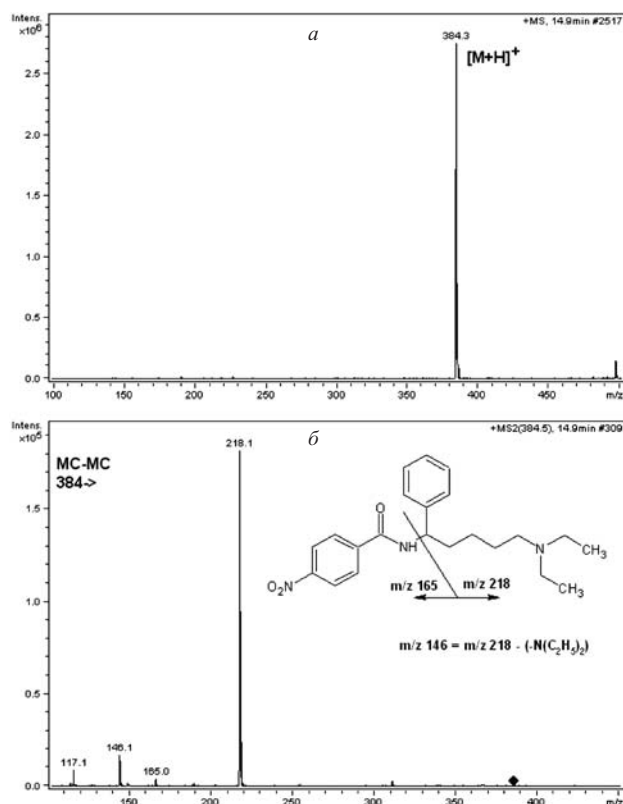


Рис. 1. Масс-спектр нибентана (а), МС-МС спектр нибентана, фрагментация массы  $m/z$  384 (б).

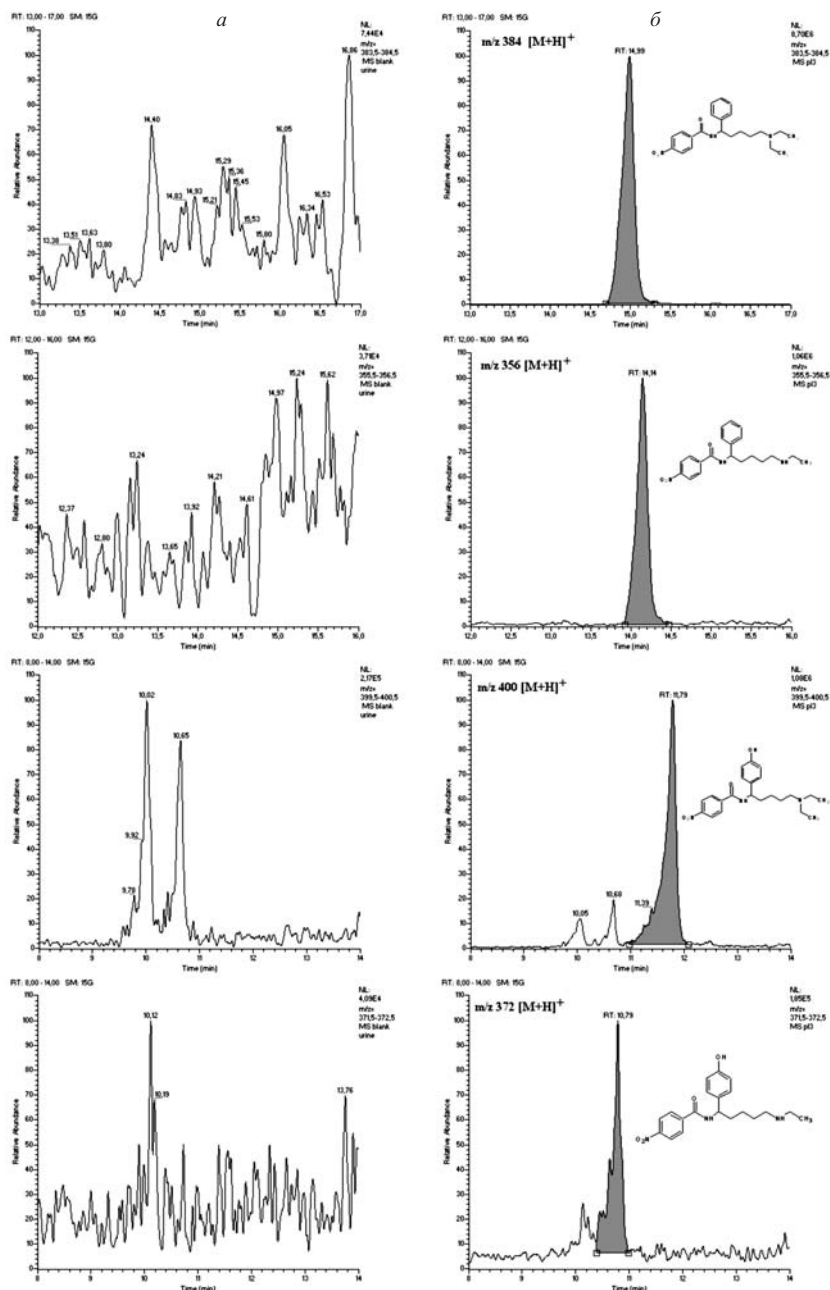


Рис. 2. Масс-хроматограмма по выделенному иону ( $m/z$  384,  $m/z$  356,  $m/z$  400,  $m/z$  372) бланковой плазмы (а) и плазмы человека после однократного внутривенного введения 0,125 мг/кг 1 % раствора нибентана (через 1 ч) (б).

### Экспериментальная часть

**ВЭЖХ-МС метод.** Хроматомасс-спектрометрический анализ выполняли на высокоэффективном жидкостном хроматографе модели 1100 фирмы Agilent Technologies (США) в сочетании с масс-спектромет-

ром типа “ионная ловушка” модели LC/MSD Trap SL фирмы Agilent Technologies (США), оснащенным внешним источником ионов с ионизацией электрораспылением при атмосферном давлении. Напряжение на капилляре и противоэлектроде (конус) составляло — 3,5 кВ и 500 В соответственно; скорость потока осу-

Таблица 1  
Молекулярная масса (ММ), время удерживания (RT), молекулярный вес протонированной молекулы и характерные МС-МС ионы

Соединение	ММ	RT, мин	$[M+H]^+$	$\Delta M$	МС-МС
Нибентан	383	14,9	384		384 → 218, 165, 146
<i>Метаболиты нибентана</i>					
Дезэтилнибентан	355	14,1	356	- 28	356 → 190, 165, 118
Гидроксинибентан	399	11,7	400	+ 16	400 → 234, 165, 162
Гидроксидезэтилнибентан	371	10,7	372	- 12	372 → 206, 165, 134

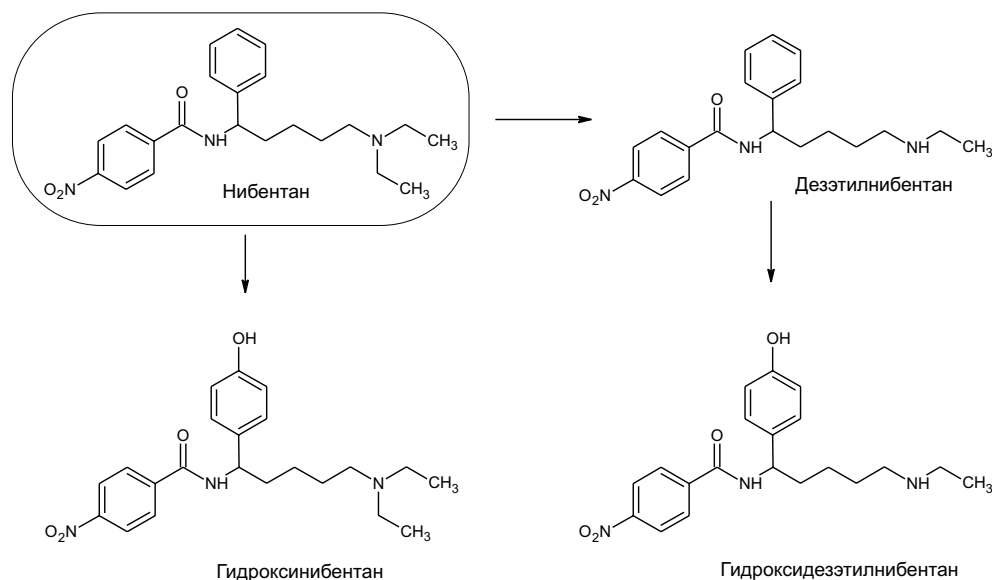


Рис. 3. Основные пути биотрансформации нибентана

шающего газа азота — 9 л/мин; температура в камере ионизации — 350 °С. Давление на распылителе 2 атм. Сканирование по полному ионному току проводили в диапазоне 100–500 а.е.м. Колонка Ultra C18, 150 × 2,1 мм, размер частиц 5 мкм, размер пор 100 Å, фирмы Restek Co., США. Элюент — 0,05 % раствор муравьиной кислоты (рН 3,0) (А) и ацетонитрил (В). Скорость потока элюента 0,2 мл/мин. Градиент: 0 мин — 15 % В; 15 мин — 60 % В; 25 мин — 85 % В, общее время анализа 30 мин.

**Прием нибентана и отбор проб.** Опыт проводился на 7 пациентах, страдающих коронарными заболеваниями (ишемия). Перед введением нибентана (1 % раствор для инъекций, производитель ООО “ЛЭНС-ФАРМ”, Москва) был произведен забор крови из периферической вены — 0 мин. Быстрое введение нибентана осуществлялось внутривенно в дозе 0,125 мг/кг. Через 15, 30, 45, 60, 240, 480 и 1440 мин после введения нибентана осуществляли забор крови из вен, отличных от места введения данного ЛС. Все пробы отбирали в вакуумные пробирки, содержащие гепарин, центрифугировали 20 мин при 4000 об/мин, полученную плазму замораживали и хранили при температуре – 20 °С до проведения анализа.

**Пробоподготовка биологической жидкости.** Для выделения нибентана и его метаболитов пробу плазмы (150 мкл) подщелачивали до рН 9,0 твердым буфером, добавляли 2 г сульфата натрия, затем экстрагировали 5 мл диэтилового эфира в течение 2 мин на экстракторе. Центрифугировали при 2500 об/мин в течение 5 мин, органический экстракт упаривали в токе азота досуха. Сухой остаток перерастворяли в 50 мкл метанола, 5 мкл вводили в систему ВЭЖХ-МС.

#### Результаты и их обсуждение

**ВЭЖХ-МС анализ стандартного раствора нибентана.** Для изучения фрагментации нибентана методом ВЭЖХ-МС нами был приготовлен метанольный

раствор стандартного образца с концентрацией 100 нг/мл. 5 мкл стандартного раствора вводили в систему ВЭЖХ-МС.

Масс-спектр нибентана, полученный методом ВЭЖХ-МС, является малоинформативным, состоит только из протонированной молекулы с  $m/z$  384  $[M+H]^+$ . МС-МС спектр был получен посредством фрагментации протонированной молекулы нибентана, в результате чего были получены дочерние ионы с  $m/z$  218, 165 и 145 (рис. 1).

**Метаболизм нибентана.** Метод ВЭЖХ-ИЭР(+)/МС был применен для анализа нибентана и его метаболитов в плазме человека. Анализ экстрактов плазмы методом ВЭЖХ-МС приводит к масс-хроматограмме образца плазмы, на которой видно, что пики продуктов метаболизма имеют более раннее время удерживания, чем сам нибентан (рис. 2), т.е. в процес-

Таблица 2  
Фармакокинетические параметры нибентана после внутривенного введения

Параметр	Единицы измерения	Внутривенное введение	
		Люди, 0,125 мг/кг	Крысы, 5 мг/кг*
$C_0 = C_{max}$	нг/мл	54,66	1190
$k_{12}$	ч <sup>-1</sup>	1,07	2,32
$k_{21}$	ч <sup>-1</sup>	0,59	2,53
$k_{el}$	ч <sup>-1</sup>	0,13	0,17
$V_d = V_1$	л	182,4	0,8
$Cl$	л/мин	0,40	0,0046
$AUC$	(нг · ч)/мл	419,3	3253,7
$t_{1/2}$	ч	5,32	4,13
$t_{1/2}^{\alpha}$	ч	0,40	0,14
$t_{1/2}^{\beta}$	ч	16,27	4,1
$MRT$	ч	7,67	5,70
$t_{max2}$	ч	2,21	0,70
$V_2$	л	347,2	0,87

\* данные получены из работы [4]

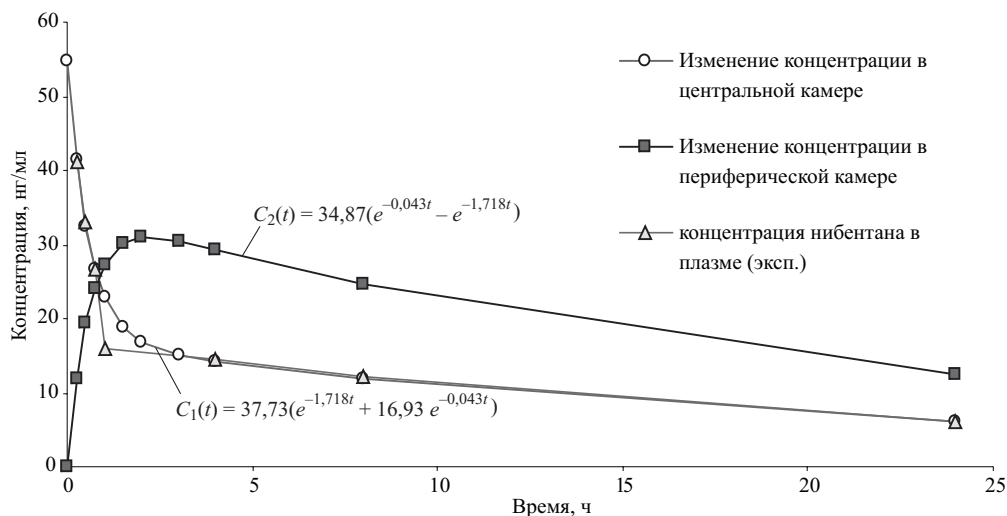


Рис. 4. Двухкамерная модель фармакокинетики нибентана

се метаболизма образовались продукты более полярные, чем исходный нибентан.

Идентификация метаболитов нибентана основывалась на анализе МС и МС-МС спектров. Неизменный нибентан ( $m/z$  384) выходит из колонки на 14,9 мин. Моногидроксилированный метаболит с молекулярным ионом 400  $m/z$  выходит на 11,8 мин. Дезэтилированный метаболит с молекулярным ионом 356 на 15 мин  $m/z$  выходит на 14,1 мин, и дезэтилированный-гидроксилированный метаболит с молекулярным ионом  $m/z$  372 выходит на 10,8 мин. Протонированные молекулы идентифицированных метаболитов отличаются от протонированной молекулы нибентана на + 16 а.е.м. (+ОН), – 28 а.е.м. (–C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) и – 12 а.е.м. (дезэтилирование с последующим гидроксилированием). МС-МС характерные ионы нибентана и его метаболитов представлены в табл. 1. МС-МС спектры нибентана и его метаболита содержат общий дочерний ион с  $m/z$  165, соответствующий 4-нитробензамидному фрагменту. Предполагаемая схема метаболизма нибентана представлена на рис. 3.

**Фармакокинетика нибентана.** Фармакокинетическая кривая содержания нибентана в плазме человека после внутривенного введения в дозе 0,125 мг/кг удовлетворительно описывается биэкспоненциальным

уравнением, соответствующим двухчастевой модели (табл. 2, рис. 4).

Методом ВЭЖХ-МС в плазме человека были найдены неизменный нибентан и его 3 метаболита — гидроксилированный метаболит, дезэтилированный метаболит и дезэтилгидроксилированный метаболит. Наиболее долгоживущим метаболитом нибентана является дезэтилированный метаболит, в плазме человека он детектировался свыше 24 ч. Дезэтилированный и дезэтилгидроксилированный метаболиты найдены в плазме человека впервые. Структуры найденных метаболитов установлены с помощью МС и МС-МС масс-спектров. Также в данной работе проведены фармакокинетические исследования нибентана.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая Волна, Москва (2000), т. 1, сс. 373 – 374.
2. Е. И. Чазов, Л. В. Розенштраух, С. П. Голицын, *Кардиология СНГ*, № 1, 1 – 5 (2003).
3. О. С. Анисимова, Н. П. Соловьева, Е. Ф. Кулешова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **31**(7), 12 – 17 (1997).
4. В. В. Чистяков, И. А. Ермаченков, И. В. Голованова, *Хим.-фарм. журн.*, **34**(9), 6 – 8 (2000).

Поступила 22.04.08

## METABOLISM AND PHARMACOKINETICS OF NIBENTAN IN HUMAN BLOOD PLASMA

S. A. Appolonova<sup>1\*</sup>, V. G. Valiev<sup>2,3</sup>, M. A. Dikunets<sup>1</sup>, A. V. Kukharenko<sup>3</sup>, G. M. Rodchenkov<sup>1</sup>, E. M. Zeltyn<sup>2</sup>, A. B. Bezprozvannyi<sup>3</sup>, V. A. Gorshkov<sup>2</sup>, and A. E. Radzevich<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Moscow Antidoping Center, Moscow, 107005 Russia;

<sup>2</sup> Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia;

<sup>3</sup> Municipal Clinical Hospital No. 52, Moscow, Russia

\* e-mail: appolonova@dopingcontrol.ru

Method for determining nibentan metabolites in the humans blood plasma is described, which is based on high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrospray ionization and ion trap mass spectral detection (LC-ESI/MSD Ion Trap SL). The proposed method ensures simultaneous determination of nibentan and its metabolites in the blood plasma. Three metabolites and parent drug were detected in the human blood plasma after a single intravenous injection of 0.125 mg/kg dose of the drug (1% nibentan). Two metabolites have been found for the first time. Verification of the results and identification of all metabolites was performed by LC-MS and LC-MS/MS. The major pharmacokinetic parameters were calculated.

Key words: nibentan, metabolism, pharmacokinetic, HPLC-MS