

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 543.544.5.068.7;943.3;612.3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФОБАЗОЛА И ЕГО ОСНОВНЫХ
МЕТАБОЛИТОВ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОЙ ГАЗОВОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ–МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИП.О. Бочков¹, А.И. Ревельский², И.В. Гуляев², Е.В. Блынская¹

¹ Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, РАМН;
² Химический факультет МГУ; e-mail: eaureus@mail.ru

Показана возможность определения целевых соединений методом ГХ–МС, а также подтверждена их структура. Проанализирована возможность сорбции исследуемых соединений в хроматографической системе. Сопоставлены результаты различных способов ввода пробы в аналитическую колонку. Разработан высокочувствительный способ определения микромолярных количеств определяемых соединений в больших по объему пробах. Пределы обнаружения исследуемых соединений составили $5 \cdot 10^{-10}$ г в пробе модельного раствора.

Ключевые слова: афобазол, метаболиты, капиллярная газовая хроматография, масс-спектрометрия, большой объем проб.

Актуальность проблемы лечения тревожных расстройств определяется их высокой распространенностью. Тревога является одной из наиболее ожидаемых реакций организма на изменение жизненного стереотипа. К противотревожным лекарственным веществам нового поколения относится афобазол, синтезированный в ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН. Афобазол, или 5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио]-бензимидазола дигидрохлорид, является представителем нового класса анксиолитиков, в котором доказанная фармакологическая активность не сопровождается в терапевтическом диапазоне доз гипноседативными эффектами, миорелаксантами свойствами и негативным влиянием на показатели памяти [1].

Одним из важнейших этапов разработки оригинального лекарственного препарата является экспериментальное изучение его фармакокинетики и метаболизма. Современная методология определения среднелетучих органических соединений основана на сочетании разных вариантов жидкостной и твердофазной экстракции с методами жидкостной и газовой хроматографии, а их использование в совокупности с разными спектроскопическими методами позволяет решать практические задачи по снижению концентрационных пределов обнаружения лекарственных веществ, а также их фармакологически активных метаболитов [2, 3].

Один из наиболее рациональных путей решения проблемы – использование совмещенных методов

анализа, таких как газовая хроматография с масс-спектрометрией (ГХ/МС) и высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС), а также капиллярный электрофорез, который может быть использован в сочетании с масс-спектрометрией [4, 5]. К основным достоинствам данных методов анализа относится возможность получения данных сразу для нескольких соединений на уровне до 0,01% [6]. Преимуществом ГХ/МС является возможность получения сведений как о молекулярной массе соединения (если масс-спектр получен в режиме химической ионизации), так и о строении фрагментарных ионов (при ионизации электронным ударом), что дает возможность с наибольшей надежностью идентифицировать структуру анализируемого соединения [7]. Также, существование масс-спектральных библиотек существенно упрощает проведение анализа. Ограничения метода связаны с невозможностью проведения анализа высокополярных и термонестабильных соединений. Проблема может быть решена путем использования реакций дериватизации, т.е. получения некоторого производного, удовлетворяющего условиям анализа. Силилирование является наиболее часто используемым способом дериватизации [8, 9]. Реагентами выступают, как правило, следующие соединения:

триметилхлорсилорексан (ТМХС),
триметилсилилимидазол (ТМСИ),
N-метил-триметилсилитрифлюороацетамид (МСТФА),

N,O-бис-(триметилсилил)-трифлюороацетамид (БСТФА),

N-(трет-бутилдиметилсилил)-N-метилтрифтороацетамид (МТБСТФА) .

Однако осуществление данных методов анализа затруднено при использовании метода ввода больших по объему проб, в том числе биологических, что в ряде случаев в ряде случаев позволяет существенно снизить концентрационный предел обнаружения.

Таким образом, с целью экспериментального изучения фармакокинетики и метаболизма оригинального лекарственного вещества афобазол, актуальным является разработка и создание высокочувствительных селективных методов анализа для определения микромолярных количеств определяемого соединения и его фармакологически активных метаболитов в пробах различного объема, в том числе, в различных биологических матрицах.

Материалы и методы

Материалы. Газовый хроматограф «Trace GC 2000» («Thermo Electron Corporation, США); капиллярная колонка «Restek RTX-200ms» (неподвижная фаза – трифторпропилметилполисилоксан; длина 30 м; внутренний диаметр 0,32 мм; толщина неподвижной фазы 0,25 мкм); капиллярная колон-

ка «Restek RTX-1ms» (неподвижная фаза – 100% диметилсилоксан; длина 30 м; внутренний диаметр 0,32 мм; толщина неподвижной фазы 0,25 мкм); масс-спектрометр «Thermo DSQ» («Thermo Electron Corporation», США), оборудованный источником ионизации методом электронного удара и квадрупольным масс-анализатором; масс-спектрометр «Polaris Q» («Thermo Finigan», США); ионизация методом электронного удара; масс-анализатор – ионная ловушка; ультразвуковая ванна «Branson 2510» («Branson», США, частота 42 кГц, выходная мощность 100 Вт); шприцы для приготовления растворов и ввода пробы в газовый хроматограф объемом 10, 250 и 500 мкл («Hamilton», США и «Agilent», Германия); флаконы для стандартных смесей и растворов стандартов типа Wheaton Mini-Vials с герметичной пробкой, снабженной тефлоновым покрытием, вместительностью 1,5 и 10 мл.

Реактивы. Пиридин «ос.ч.» («Lecbiopharm», Россия); метилтретбутиловый эфир (МТБЭ, «Scharlau», Испания); метанол «х.ч.», («Химреактив», Россия); N,O-бис-(триметилсилил)-трифторацетамид (БСТФА, «Regis», США); гидрокарбонат натрия («Фармамедикал», Россия).

Данные об объектах исследования содержатся в таблице.

Объекты исследования

Название, условные обозначения	Структурная формула	Брутто-формула	Молекулярная масса
Афобазол-2-(2-морфолиноэтилтио)-5-этоксibenзимидазола дигидрохлорид		$C_{15}H_{20}ClN_3O_3S$	380,33
М-3-2-(2-морфолиноэтилтио)-5-гидроксибензимидазол		$C_{13}H_{17}N_3O_2S$	279,36
М-11-2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)этилтио]-5-этоксibenзимидазола гидрохлорид		$C_{15}H_{19}N_3O_3S$	357,86

Методы

Методика получения раствора оснований афобазола и метаболитов М-11, М-3

Стандартные навески афобазола дигидрохлорида (масса навесок составляла около 0,5 мг) переносят в стандартный флакон вместимостью 10 мл. Навеску растворяют в 1 мл дистиллированной воды. К полученному раствору добавляют 1 мл метилтретбутилового эфира (МТБЭ), избыток NaHCO_3 . Далее, реакционный флакон помещают на ультразвуковую баню на 7 мин, отбирают половину эфирного слоя. Переносят в стандартный флакон вместимостью 1,5 мл, закрывают герметичной пробкой. Методика получения основания метаболита М-11 и условия проведения анализа методом ГХ/МС аналогична описанному выше. Таким образом, модельные растворы представляли собой растворы оснований афобазола и его метаболита М-11 в МТБЭ. Производное метаболита М-3 получают по реакции дериватизации вещества силирующим агентом БСТФА. К стандартной навеске соединения массой ~0,5 мг добавляют 100 мкл БСТФА и 50 мкл пиридина. Полученный раствор герметично закрывают пробкой, помещают на ультразвуковую баню на 20 мин. Затем упаривают досуха. Добавляют 1 мл МТБЭ. Полученный раствор используют для анализа методом ГХ/МС. Объем пробы, используемой для анализа, составляет 1 мкл. Концентрации анализируемых соединений в модельных растворах составляли $\sim 5 \cdot 10^{-7}$ г/мкл.

Условия проведения анализа методом ГХ/МС

Ввод пробы проводится при разных температурах инжектора (250, 260 и 270°C). Нагрев термостата колонок проводится по нескольким температурным программам: 40°C (5 мин), 7°C/мин до 250°C, 250°C (5 мин); 40°C (5 мин), 25°C/мин до 250°C, 250°C (5 мин); 40°C (5 мин), 30°C/мин до 270, 270°C (5 мин). Значения температуры интерфейса между хроматографом и масс-спектрометром устанавливаются равными 250, 260 и 270°C.

Условия регистрации масс-спектров соединений

Ионизация молекул образца проводилась методом электронного удара. Энергия ионизирующих электронов составляла 70 эВ. Значение температуры источника ионов составляло 250°C. Диапазон сканирования масс $m/z = 50-650$ дальтон.

Результаты и обсуждение

По данным масс-спектральных характеристик и встречного химического синтеза установлено, что

основными продуктами биотрансформации афобазола являются гидроксилированный по ароматическому кольцу бензимидазольного цикла 2-(2-морфолиноэтилтио)-5-гидроксибензимидазол (условно обозначенный М-3) и окисленный по морфолиновому кольцу 2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)этилтио]-5-этоксибензимидазол (условно обозначенный М-11). Таким образом, афобазола дигидрохлорид, а также соли метаболитов М-11 и М-3 были предложены для дальнейшего фармакологического изучения. Однако метод ГХ/МС не позволяет проводить анализ данных солей напрямую, поэтому на предварительной стадии по реакции гидролиза из имеющихся солей афобазола и его метаболита М-11 получали основания целевых соединений.

Растворы каждого из определяемых веществ анализировали отдельно для выявления особенностей аналитического сигнала (времени выхода из колонки, формы пика на хроматограмме, масс-спектра), подтверждения предположения о термостабильности и летучести определяемых веществ и оптимизации условий ГХ/МС анализа. Для метаболита М-3 проводили анализ раствора как самого вещества, так и его триметилсилильного производного. На основании выявленных на хроматограмме интенсивных пиков, предположительно относящихся к определяемым веществам, нами осуществлена регистрация масс-спектров соединений (рис. 1). В состав масс-спектров входят молекулярные ионы и характеристичные фрагментарные ионы, отражающие особенности структуры каждого соединения, и, соответственно, по полученным масс-спектрам были подтверждены структуры афобазола и его метаболитов М-3 и М-11. Основные пути фрагментации афобазола и его метаболитов представлены на рис. 2.

На основании анализа состава масс-спектров и по виду хроматограмм можно сделать заключение о том, изучаемые соединения являются термостабильными и летучими в выбранных условиях анализа.

Различие в значениях m/z характеристичных ионов афобазола и М-11 (194 и 128 соответственно) позволяет (в совокупности со значением времени удерживания) с высокой долей вероятности обнаруживать эти соединения даже в случаях, когда на хроматограммах по полному ионному току пиков, соответствующих веществам, не зарегистрировано. Значения m/z характеристичных ионов М-3 совпадают со значениями для М-11 и их можно обнаружить только в случае полного разделения на колонке. Значение m/z характеристичного иона ТМС производного метаболита М-3 (238) значительно отличается как от значений соответствующих как афобазолу и так и М-11. Таким

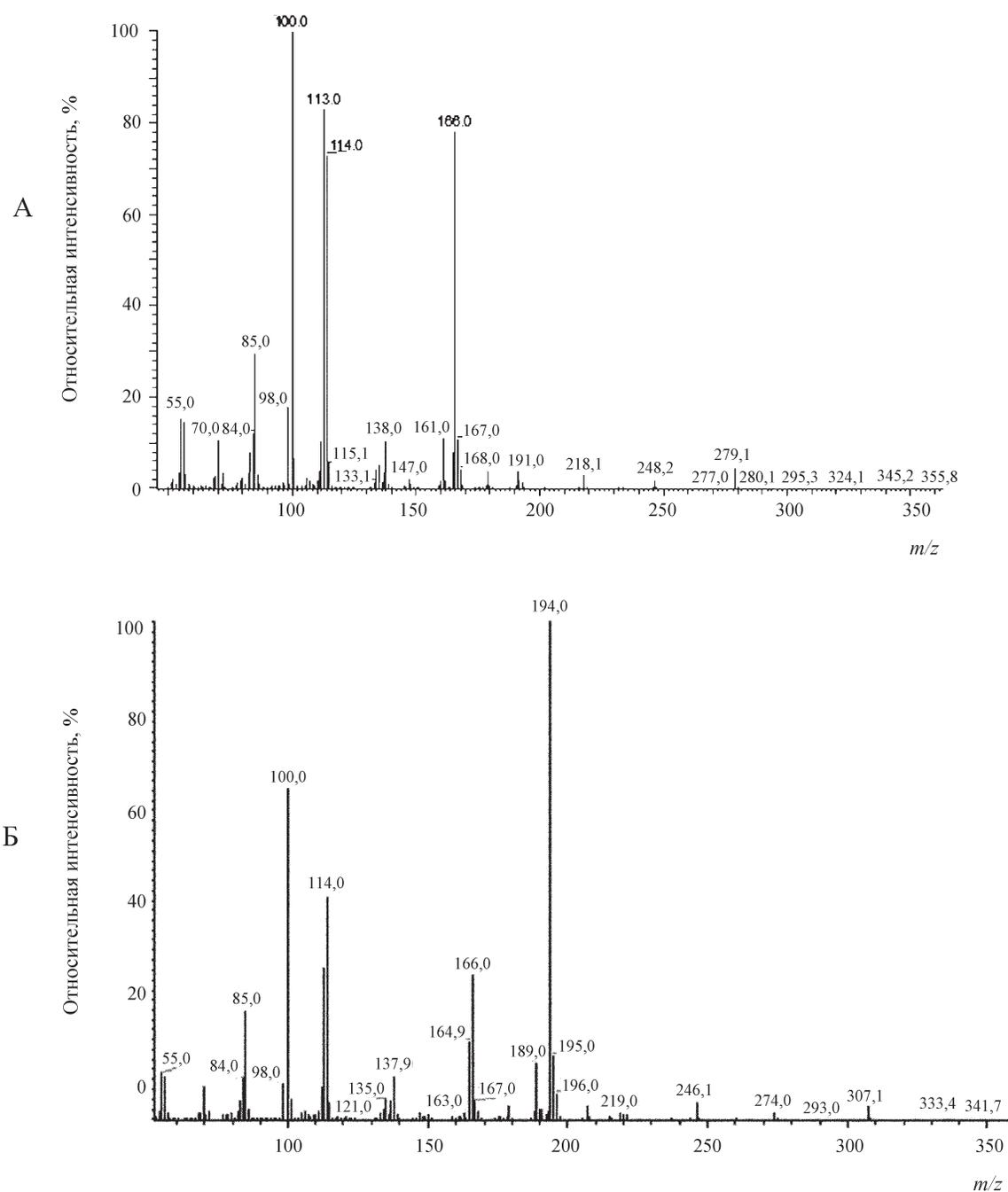


Рис. 1. Масс-спектры: А – афобазола, Б – модельного раствора М-3

образом, в случае неполного разделения пиков афобазола, М-11 и ТМС производного метаболита М-3 и содержания их в пробе на низком уровне, они однозначно обнаруживаются по масс-хроматограммам характеристичных ионов и временам удерживания, что обуславливает дальнейший выбор ТМС производного метаболита М-3 в качестве объекта исследования. Это позволяет осуществлять быстрый хроматографический анализ с неполным разделением пиков определяемых веществ на хроматограммах.

Значительные площади зарегистрированных пиков позволили предположить, что при анализе раз-

бавленных в 10 и 100 раз растворов определяемых веществ удастся зарегистрировать аналитические сигналы исследуемых соединений.

Первоначально удалось зафиксировать аналитические сигналы для модельных растворов с содержанием исследуемых соединений лишь на уровне $5 \cdot 10^{-8}$ г/мкл (на уровне пределов обнаружения). Анализ модельных растворов с концентрацией определяемых компонентов на уровне $5 \cdot 10^{-9}$ г/мкл в пробе результатов не дал.

Так как разложения определяемых веществ выявлено не было, предположили наличие сорбции опре-

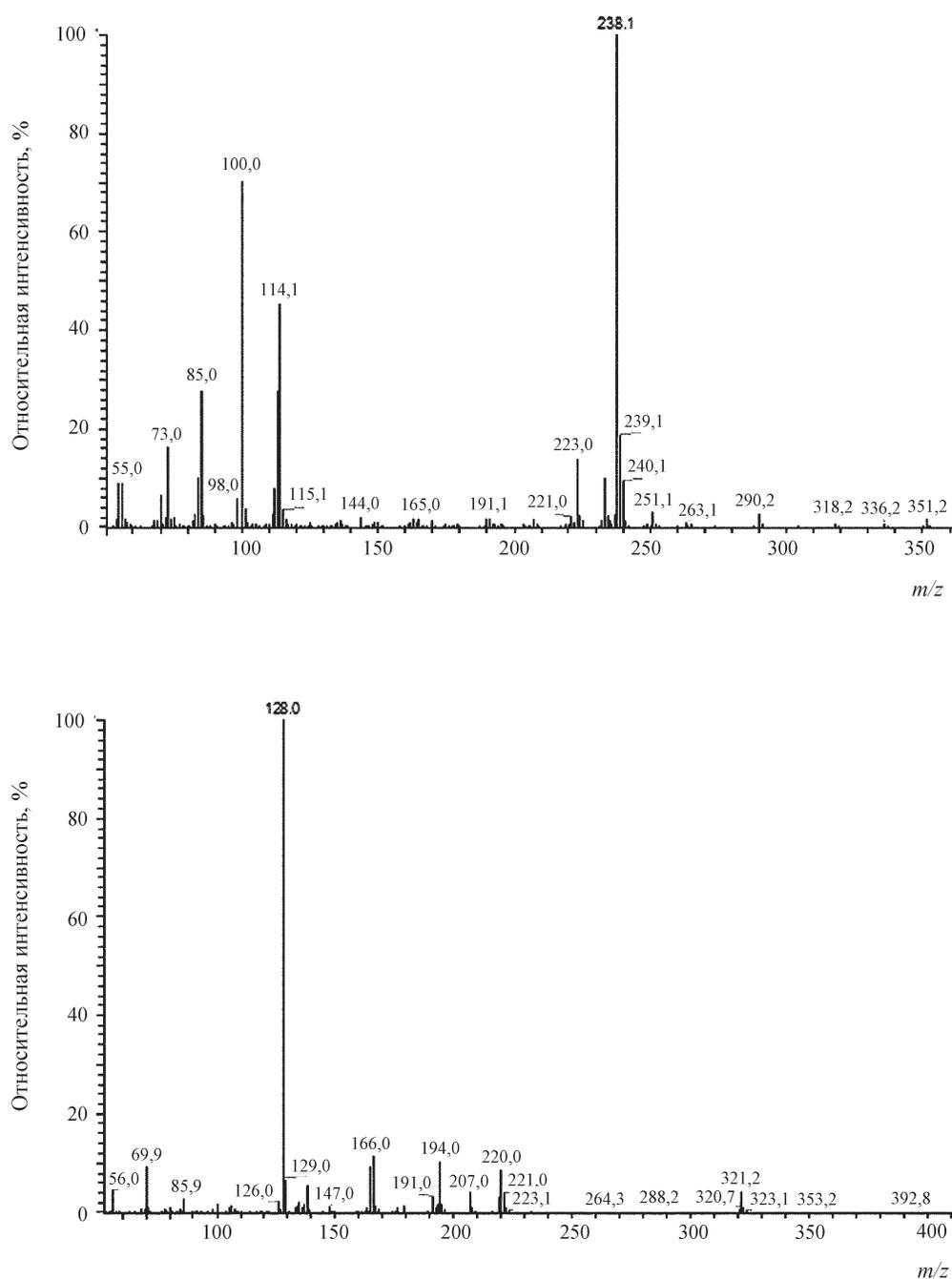


Рис. 1. (продолжение). Масс-спектры: В – модельного раствора ТМС-производного метаболита М-3, Г – модельного раствора М-11

деляемых соединений в хроматографической системе и, в первую очередь, в инжекторе.

Для подтверждения выдвинутого предположения нами осуществлено хроматографирование афобазола, ТМС производного метаболита М-3, соединения М-11 в измененных условиях (результаты представлены на рис. 3). Для этого пробу вводили в колонку, минуя инжектор, нанося раствор в кварцевый лайнер специального термодесорбера. Растворитель испаряли, а сконцентрированные определяемые вещества в

потоке гелия при температуре термодесорбера 260 и 270°C переносили в колонку (находящуюся при комнатной температуре) в течение 5–10 мин. Скорость потока гелия 3 см³/мин. Оптимальное время процесса термодесорбции составило 10 мин. Для нагрева термостата колонок в качестве наиболее оптимальной была выбрана следующая температурная программа: 40°C (0 мин), 30°C/мин до 270, 270°C (5 мин).

Изучение хроматограммы раствора афобазола, ТМС производного метаболита М-3, соединения

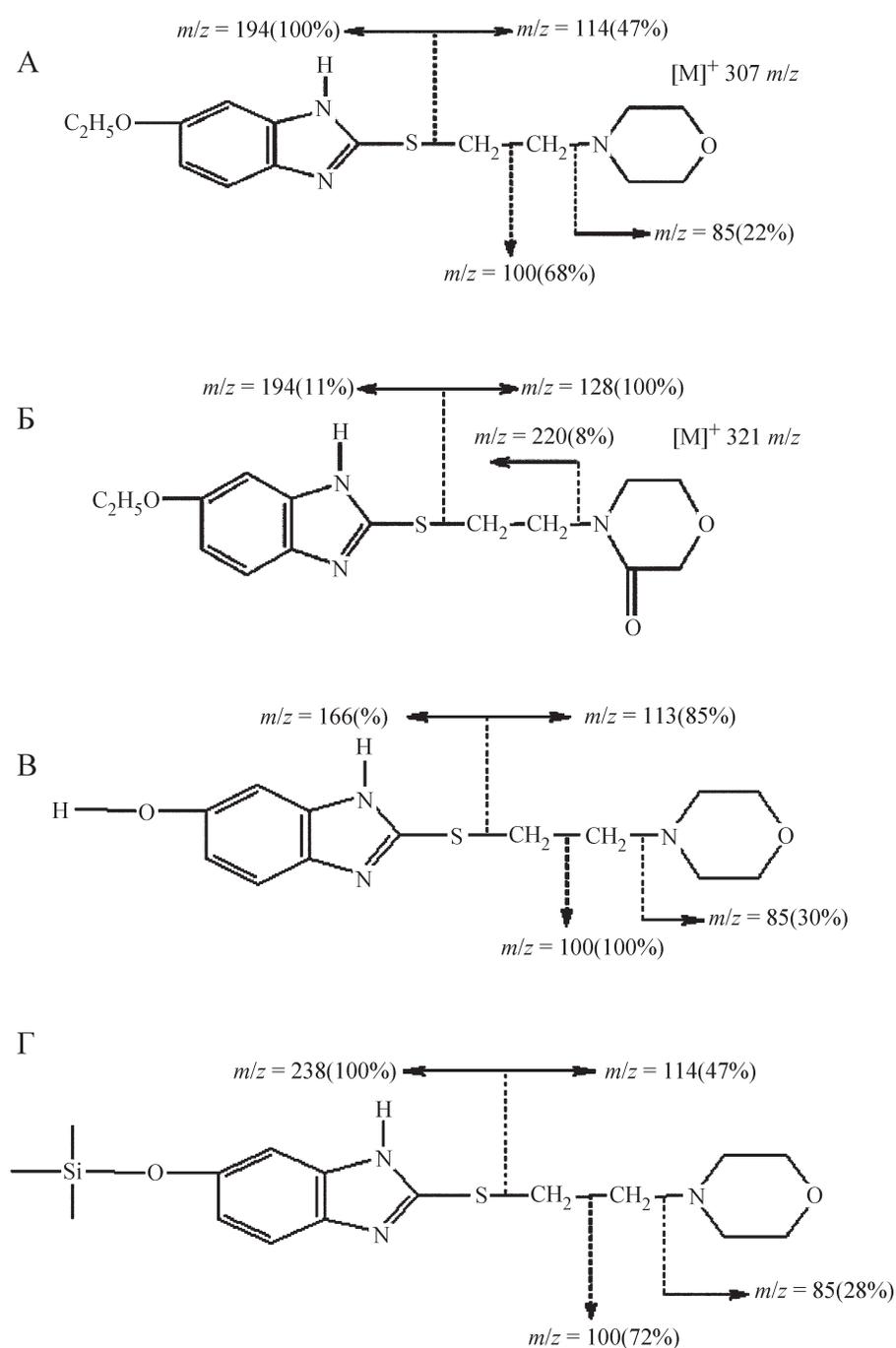


Рис. 2. Основные направления фрагментации афобазола (А), модельного раствора М-3 (Б), модельного раствора ТМС-производного метаболита М-3 (В), модельного раствора М-11 (Г) при ионизации молекулы соединения методом электронного удара

М-11 с концентрацией $3-5 \cdot 10^{-7}$ позволило сделать вывод о росте аналитических сигналов исследуемых веществ, что послужило основой для дальнейшего изучения возможности снижения концентрационных пределов обнаружения.

Мы экспериментально изучили условия ввода больших по объему проб органических растворов в ГХ/МС, включающие в себя замену стандартного ввода пробы объемом 1 мкл на объем по 10 и 100

мкл соответственно (рис. 4). С этой целью осуществлялось концентрирование определяемых веществ в лайнере термодесорбера с одновременным удалением паров растворителя, с последующим их переносом в колонку в потоке гелия при нагревании. На основании экспериментальных данных, показанных в хроматограммах, можно делать вывод о значительном росте аналитических сигналов исследуемых веществ. В частности, наибольшие значения изменения ро-

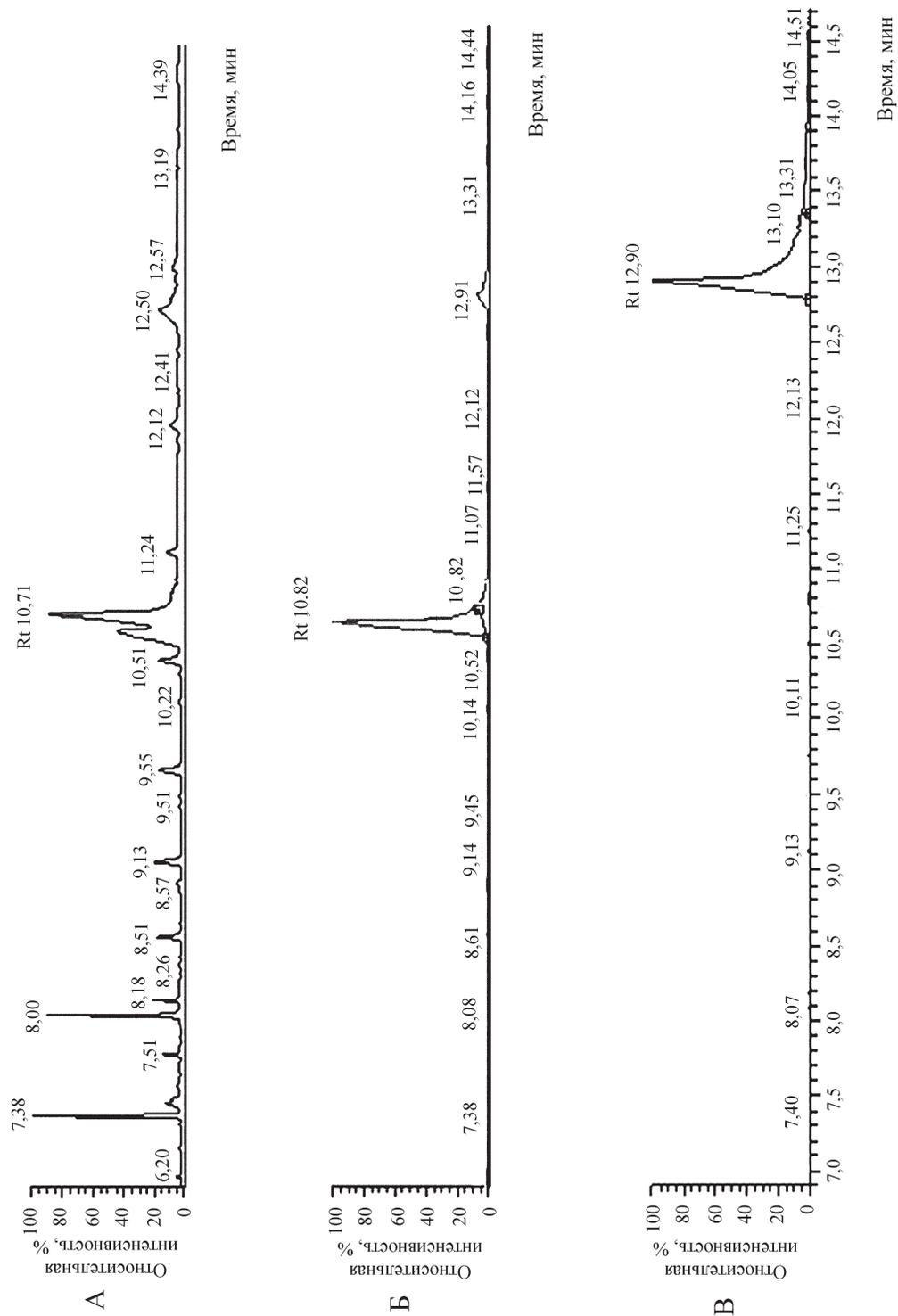


Рис. 3. Масс-хроматограммы: А – афабазола ($m/z = 194$, $R_t = 10,71$ мин), Б – ТМС-производного метаболита М-3 ($m/z = 238$, $R_t = 10,82$ мин), В – М-11 ($m/z = 12,8$, $R_t = 12,90$ мин)

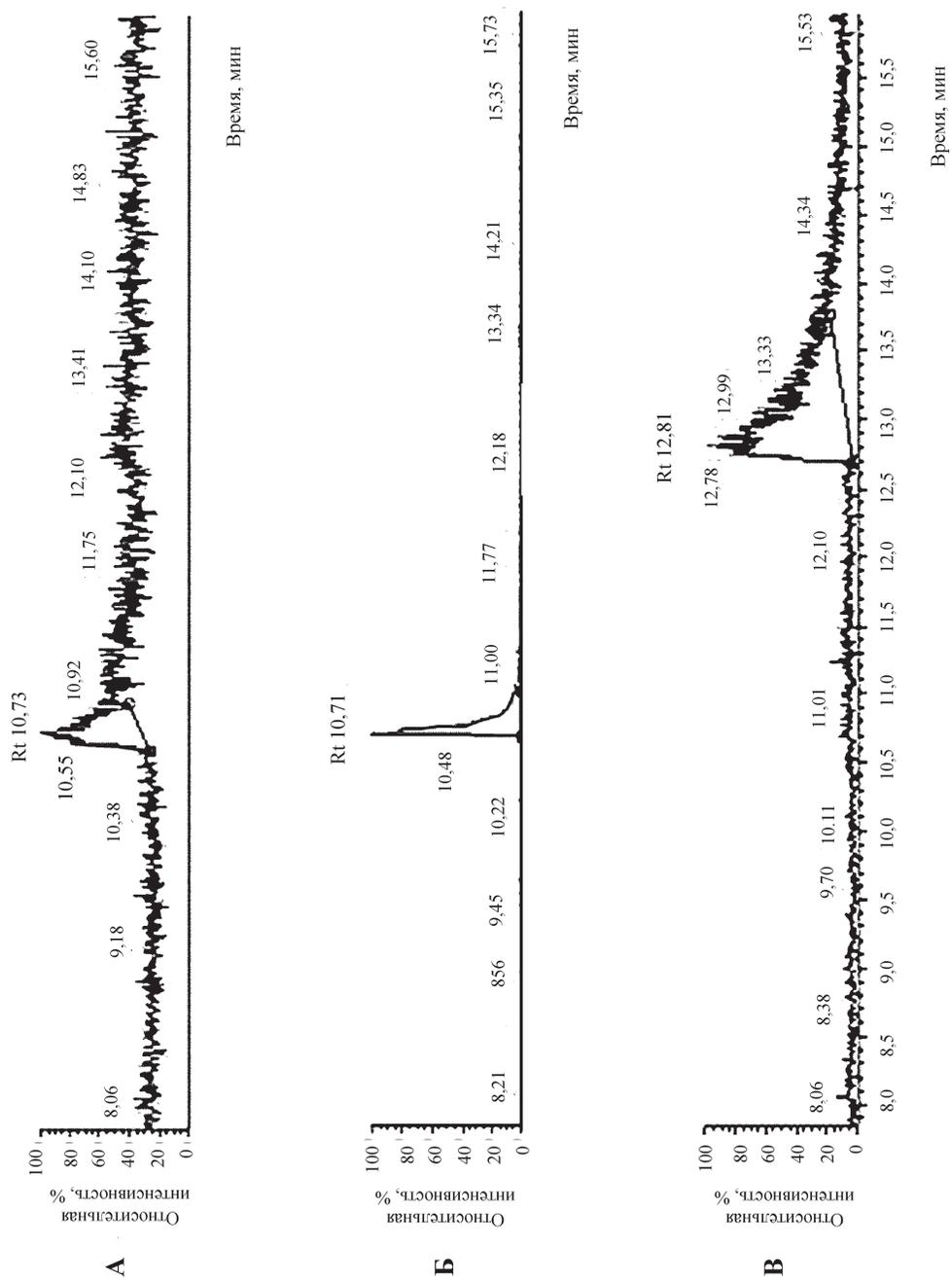


Рис. 4. Масс-хроматограммы: А – афобазола ($m/z = 194$, $R_t = 10,73$ мин), Б – ТМС-производного метаболита М-3 ($m/z = 238$, $R_t = 10,71$ мин), В – М-11 ($m/z = 128$, $R_t = 12,81$ мин), полученные при вводе больших по объему проб модельных растворов (концентрация $5 \cdot 10^{-10}$ г, объем пробы 100 мкл)

ста аналитических сигналов отмечены для метаболита М-11. При вводе пробы с концентрациями $5 \cdot 10^{-9}$ г/мкл также удалось зарегистрировать аналитические сигналы определяемых веществ. Важно отметить, что пики анализируемых соединений на хроматограммах достаточно размыты. Вероятно, решение проблемы заключается в использовании капиллярной колонки с неподвижной фазой, состоящей из 5% фенила и 95% диметилполисилоксана.

Таким образом, с целью экспериментального изучения фармакокинетики и метаболизма оригинального лекарственного вещества афобазол, нами разрабо-

тан высокочувствительный метод анализа для определения микромолярных количеств непосредственно самого афобазола, а также его фармакологически активных метаболитов в больших по объему пробах. Этот способ можно, в частности, использовать для определения афобазола и его метаболитов в разных биологических матрицах. Нами предложены условия проведения ГХ/МС-анализа исследуемых соединений, разработана методика определения афобазола и его метаболитов, позволяющая снизить пределы обнаружения исследуемых соединений до $5 \cdot 10^{-10}$ г в пробе модельного раствора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смуглевич А.Б., Андрющенко А.В., Романов Д.В. // Русский медицинский журнал. М., 2006. **14**. № 9. С. 725.
2. Szafarz M., Szymura-Oleksiak J., Zakrzewska A. et al. // J. Chromat. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2012. **3**. P. 9.
3. Виглинская А.О. Дис. ... канд. мед. наук. М., 2007.
4. Cartiser N., Bévalot F., Le Meur C. et al. // J. Chromat. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2011. **879(27)**. P. 2909.
5. Shaik I.H., Mehvar R. // J. Pharm. Sci. 2011. **100**. P. 5281.
6. Жердев В.П., Лутвин А.А. // Клин. фармакокинетика. 2005. № 2. С. 1.
7. Kudo K., Ishida T., Hikiji W. et al. // Forensic Toxicol. 2009. **27**. P. 21.
8. Parasrampur R., Shaik I.H., Mehvar R. // J. Pharm. Sci. 2012. **2**. P. 318.
9. Marchei E., Papaseit E., Garcia-Algar O.Q. et al. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2012. **60**. P. 26.

Поступила в редакцию 10.03.13

DEFINITION OF AFOBAZOLE AND ITS BASIC METABOLITES A METHOD OF A CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY

P.O. Bochkov, A.I. Revelskiy, I.V. Guljaev, E.V. Blynskaya

(Department of the Russian Academy of Medical Sciences of Zakusov scientific research institute of pharmacology of the Russian Academy of Medical Science. Russia, Moscow; Department of Chemistry Lomonosov Moscow State University)

The possibility of the analysis of target compounds is shown by method GH/MS, and also their structure are confirmed. The possibility of sorption of investigated compounds in chromatographic system is analysed. The results of various ways of input of the probe in an analytical column are compared. The high-sensitivity method of the analysis is developed for definition of microquantities of defined compounds. Limits of detection of investigated compounds were $5 \cdot 10^{-10}$ g in probe of a modeling solution.

Key words: afobazole, metabolites, a capillary gas chromatography, mass spectrometry, great volume of tests.

Сведения об авторах: Бочков Павел Олегович – аспирант лаборатории фармакокинетики Научно-исследовательского института фармакологии имени В.В. Закусова РАМН (bok-of@yandex.ru); Ревельский Александр Игоревич – вед. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (sorbent@yandex.ru); Гуляев Иван Владимирович – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (avmsu@mail.ru); Блынская Евгения Викторовна – ст. науч. сотр. лаборатории готовых лекарственных форм Научно-исследовательского института фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, канд. фарм. наук (eaureus@mail.ru).