

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2-(ЭТИЛТИО)БЕНЗИМИДАЗОЛА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В
МОЧЕ КРЫС МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ В СОЧЕТАНИИ С ТАНДЕМНОЙ МАСС-
СПЕКТРОМЕТРИЕЙ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ**

Кискина А.Р., Орлова О.И., Савельева Е.И., Каракашев Г.В.,

Ленинский М.А., Уколов А.И.

«Научно исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»

Федерального медико-биологического агентства»

188663, Ленинградская обл., Всеволожский район, г.п. Кузьмолковский, ст. Капитолово,

8(999)210-92-55, kiskina-aleksandra@rambler.ru

Резюме. Бемитил - 2-(этилтио)бензимидазола гидрохлорид, является актопротектором, используемым для повышения устойчивости организма к гипоксии, в том числе и для повышения толерантности организма к физическим нагрузкам. Включение бемитила в мониторинговую программу ВАДА обусловило необходимость разработки методики определения 2-(этилтио)бензимидазола в моче, идентификации его метаболитов и оценки временного окна, в течение которого возможно установление факта приема этого препарата по результатам анализа мочи. Целью исследования было установление структуры возможных мочевых метаболитов 2-(этилтио)бензимидазола, разработка методики его количественного определения и качественного обнаружения его метаболитов в моче, а также определение сроков их выведения из организма в доклиническом исследовании. Раствор субстанции бемитила в дозе 25 мг/кг вводили крысам внутривентрикулярно в течение трех дней в ежедневной однократной дозе 25 мг/кг. Суточную мочу крыс отбирали в течение 29 дней. Анализ полученных проб осуществляли методом тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) высокого разрешения. Для идентификации метаболитов использовали мочу крыс после введения высокой дозы бемитила 100 мг/кг. Разработана методика количественного определения 2-(этилтио)бензимидазола в моче с пределом обнаружения 5 нг/мл. В моче крыс обнаружено 6 метаболитов бемитила, в ряду которых 2 могут быть отнесены к ретроспективным биомаркерам. Установлено, что 2-(этилтио)бензимидазол и основные метаболиты выводятся из организма в течение нескольких суток, после чего продолжается выведение их остаточных количеств, и на момент окончания эксперимента (29 суток) их концентрация в моче все еще превышала предел обнаружения, установленный методикой.

Ключевые слова: Бемитил, 2-(этилтио)бензимидазол, метаболиты, ВЭЖХ-МС/МС, моча.

MEDLINE.RU, ТОМ 21, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 18 МАЯ 2020

**DETERMINATION OF 2-(ETHYLTHIO)BENZIMIDAZOLE AND ITS METABOLITES
IN RAT URINE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY–TANDEM HIGH-RESOLUTION
MASS SPECTROMETRY**

Kiskina A.R., Orlova O.I., Savelieva E.I., Karakashev G.V., Leninskij M.A., Ukolov A.I.

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology, and Human Ecology,

Federal Medical-Biological Agency

Kapitolovo Station, Vsevolozhsk District, Leningrad Region, 188663 Russia

Abstract. Bemithyl [2-(ethylthio)benzimidazole hydrochloride] is an actoprotector used for enhanced body's resistance to hypoxia, including better tolerance to physical stress. The inclusion of bemithyl in the WADA monitoring program necessitated the development of a method for the determination of 2-(ethylthio)benzimidazole in urine, identification of its metabolites and evaluation of the time window for detectable administration of this drug from the results of urine analysis. The goal of the present work was to identify urine metabolites of 2-(ethylthio)benzimidazole, to develop a procedure for the quantification of this drug and qualitative detection of its metabolites in urine and to determine their excretion time in preclinical study. A solution of bemithyl substance was intragastrically injected in rats for 3 days in a single daily dose of 25 mg/kg. Daily rat urine was collected for 29 days. The samples were analyzed by high-performance liquid chromatography hyphenated to tandem high-resolution mass spectrometry (HPLC–HRMS/MS). Bemithyl metabolites were identified in urine samples of rats exposed to an ultrahigh dose of bemithyl (100 mg/kg). A procedure for the quantification of 2-(ethylthio)benzimidazole in urine with the detection limit of 5 ng/mL was developed. Six metabolites of 2-(ethylthio)benzimidazole were identified in rat urine, of which two can be considered as retrospective biomarkers. It was established that 2-(ethylthio)benzimidazole and its main metabolites are excreted from the body within a few days and then only trace amounts of these analytes were detected in the urine samples throughout the entire experimental period (29 days). However, at the 29th day, the urine concentrations of bemithyl and its metabolites were still higher than the detection limit of the developed procedure.

Keywords: Bemithyl, 2-(ethylthio)benzimidazole, metabolites, HPLC-MS/MS, urine.

Введение.

Бемитил (2-этилтиобензимидазола гидробромид) — производное бензимидазола, по фармакологическому действию относится к актопротекторам, повышает устойчивость организма к гипоксии и увеличивает работоспособность при физических нагрузках [1]. Бемитил был синтезирован и изучен на кафедре фармакологии Военно-медицинской

академии группой ученых, возглавляемой В.М.Виноградовым. В основе механизма действия бемитила лежит активация синтеза белка, а точнее РНК, чем, однако, не исчерпываются его биологические эффекты, все новые грани которых открываются по мере продолжения исследований [2].

Вместе с тем, большинство упомянутых исследований носит медицинский характер, в то время как химические процессы, происходящие в организме, остаются неизученными. Метаболизм бемитила изучен недостаточно. Авторами [3] сообщается, что в крови идентифицированы окисленные формы 2-(этилтио)бензимидазола (2- сульфинил – и 2 – сульфонил- этилимидазолы). Среди мочевых метаболитов идентифицирован только глюкуронид [4], который рассматривается как более долгоживущий в сравнении с неизмененным 2-(этилтио)бензимидазолом. Авторы цитируемой работы оценивали сроки возможного обнаружения препарата в моче человека и утверждают, что непосредственно 2-(этилтио)бензимидазол удастся обнаружить в моче добровольцев спустя 58 часов после приема бемитила, в то время, как его глюкуронид определяют до 78 часов после приема препарата. С использованием техники ВЭЖХ-МС/МС был достигнут предел обнаружения 5 нг/мл. Относительно других возможных мочевых метаболитов бемитила какие-либо литературные данные недоступны.

В связи с дефицитом сведений о профилях экскреции 2-(этилтио)бензимидазола и его метаболитов продолжение исследований в этой области представляет значительный интерес.

Целью исследования было установление структуры возможных мочевых метаболитов 2-(этилтио)бензимидазол, разработка методики количественного определения 2-(этилтио)бензимидазола и качественного обнаружения его метаболитов в моче, а также определение сроков их выведения из организма в доклиническом исследовании с учетом предела обнаружения, достигаемого в рамках разработанной методики.

Материалы и методы

Постановка доклинического эксперимента

Условия работы с экспериментальными животными соответствовали «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)» (утв. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации 19.06.2003 N 267). В эксперименте было задействовано 7 крыс, прошедших ветеринарный контроль и карантин, массой 280-310 г. В течение всего эксперимента крысы имели свободный доступ к воде. Мочу крыс отбирали ежедневно с использованием метаболических камер. В течение 2-х суток у крыс отбирали образцы контрольной мочи. Затем в течение 2-х суток внутрижелудочно

вводили водный раствор бемитила в однократной суточной дозе 25 мг/кг. Объем вводимого раствора составлял $0,5 \pm 0,05$ мл с учетом массы животного. На третий день 5 крыс были выведены из эксперимента, а две получили третью дозу бемитила 25 мг/кг, после чего в течение 26 дней у них продолжался отбор суточной мочи.

Для получения образца мочи с высоким содержанием метаболитов использовали объединенную суточную мочу крыс, собранную после внутрижелудочного введения сверхвысокой дозы бемитила: 330 мг/кг, что соответствовало введению 1 мл раствора с концентрацией 100 нг/мл.

В эксперименте использовали стандартный образец предприятия субстанции бемитила, в котором по данным ЯМР содержание основного вещества составляло не менее 95 %. При разработке методики использовали аликвоты пулированной мочи, отобранной до начала введения бемитила, содержащей искусственные добавки бемитила.

В качестве растворителей и элюентов использовали деионизованную воду, ацетонитрил (ТУ 6-09-5497-91); муравьиную кислоту (ОСЧ, CAS 64-18-6).

Подготовка пробы мочи к анализу

К 300 мкл пробы мочи добавляли 900 мкл ацетонитрила, центрифугировали 5 мин при 14 000 об/мин, отбирали надосадочную жидкость и анализировали методом (ВЭЖХ-МС/МС). Этот способ, так называемый, метод «dilute&shoot», отличается высокой экспрессностью, исключает стадию концентрирования и разрушения глюкуронидных комплексов, что обеспечивает их прямое определение методом ВЭЖХ-МС/МС.

ВЭЖХ-МС/МС определение 2-(этилтио)бензимидазола и идентификация его метаболитов

Для обнаружения и идентификации метаболитов 2-(этилтио)бензимидазола использовали хроматомасс-спектрометрический комплекс LTQ Orbitrap Velos с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении и программным обеспечением для управления и обработки данных «Xcalibur».

Условия хроматографирования:

Колонка: Zorbax SB-C8 (Agilent) (150 мм x 4,6 мм x 1,8 мкм); температура термостата колонки 35°C; скорость потока подвижной фазы 0,4 мл/мин; градиентное элюирование (0 мин – 95% А, 1 мин – 95% А, 8 мин – 50% А, 9 мин – 10% А, 12 мин – 10% А, 12,1 мин – 95% А; 15 мин 95% А); Объем вводимой пробы 0,01 мл;

Подвижная фаза: компонент А – 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде; компонент В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле категории для градиентной ВЭЖХ;

Условия масс-спектрометрического детектирования:

Поток газа-осушителя -45 у.е.;

Температура газа- осушителя - 300°C;

Поток вспомогательного газа - 15 у.е.;

Температура вспомогательного газа - 380°C;

Напряжение на распылителе - 3500 В;

Нормализованная энергия коллизии - 35 %

Детектирование проводили в режиме положительной ионизации.

Для бемитила установлен следующий характеристичный МС/МС переход: 179.06375→151,03037.

Количественное ВЭЖХ-МС/МС определение 2-(этилтио)бензимидазола и его метаболитов в образцах проб мочи крыс, полученной в доклиническом эксперименте

Определение содержания 2-(этилтио)бензимидазола и его метаболитов в пробе мочи проводили методом ВЭЖХ-МС/МС на жидкостном хроматографе Ultimate 3000, оснащенный автодозатором, с масс-селективным детектором Q Exactive с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении и программным обеспечением для управления и обработки данных «Xcalibur».

Условия хроматографирования:

Колонка SB C-8 Agilent (4,6 мм×150 мм, 1,8 мкм); температура термостата колонки 35°C; скорость потока подвижной фазы 0,4 мл/мин; градиентное элюирование (0,0-1,0 мин – 5 %В, 8,0 мин – 50% В, 9,0-12,0 мин – 90 %В, 12,1-15,0 мин – 5 %В); Объем вводимой пробы 0,05 мл;

Подвижная фаза: Элюент А (Н₂О+0,1% НСООН) / Элюент В (СН₃СН+0,1%НСООН);

Условия масс-спектрометрического детектирования:

Поток газа-осушителя -45 у.е.;

Температура газа- осушителя - 300°C;

Поток вспомогательного газа - 15 у.е.;

Температура вспомогательного газа - 380°C;

Напряжение на распылителе - 3500 В;

Нормализованная энергия коллизии - 35 %

Детектирование проводили в режиме положительной ионизации (характеристичные ионные переходы указаны в таблице 1). Время детектирования – 15 мин.

Результаты и обсуждение

Обнаружение основных мочевых метаболитов 2-(этилтио)бензимидазола

Идентификацию аналитов осуществляли в моче крыс, отобранной в течение суток

после введения высокой дозы бемитила (100 мг/кг) с помощью программного обеспечения Thermo MetWorks, разработанного фирмой Thermo Fisher Scientific для поиска метаболитов лекарственных и иных препаратов.

Результаты программного поиска метаболитов 2-(этилтио)бензимидазола были проанализированы. Для аналитов установлены времена удерживания ($T_{\text{удерж.}}$), предполагаемая структура и характеристичные ионные переходы в условиях МС/МС анализа. Значения указанных параметров приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Идентификационные характеристики 2-(этилтио)бензимидазола и его метаболитов в условиях ВЭЖХ-МС/МС анализа

Вещество	$T_{\text{удерж.}}$ мин	Характеристичные ионные переходы (m/z)	Брутто- формула
2-(этилтио)бензимидазол	10,7	179,064→151,02920	$C_9H_{10}N_2S$
Метаболит 1 (M1)	9,9	151,0325→93,05490	$C_7H_6N_2S$
Метаболит 2 (M2)	9,4	195,059→167,02319	$C_9H_{10}O_2N_2OS$
Метаболит 3 (M3)	10,7	227,049→181,00249	$C_9H_{10}N_2O_3S$
Метаболит 4 (M4)	9,9	275,015→195,054	$C_9H_{10}N_2O_4S_2$
Метаболит 5* (M5)	10,0	280,069→151,0325	$C_{12}H_{13}N_3O_3S$
Метаболит 6 (M6)	9,7	371,091→195,054	$C_{15}H_{18}N_2O_7S$

Все предполагаемые метаболиты были обнаружены в пробах мочи крыс, получавших бемитил, но отсутствовали в образцах бланковой мочи. На данном этапе исследований структура метаболитов может быть установлена лишь предположительно, в то время как биологические процессы, лежащие в основе метаболических превращений 2-(этилтио)бензимидазола, в целом можно считать установленными. Метаболит M1 образуется в результате деэтилирования исходной молекулы, M2 – окисления кислородом до S^{4+} , M3 – ароматического гидроксирования и окисления кислородом до S^{6+} , M4 – деэтилирования с последующим присоединением сульфэтильной группы. Наиболее

обильный метаболит М5 с высокой степенью вероятности можно считать аддуктом 2-(этилтио)бензимидазола с ацетилцистеином, а М6 – глюкуронидом окисленной формы.

Разработка методики количественного определения содержания 2-(этилтио)бензимидазола и оценочных уровней его метаболитов в моче крыс

Подготовка проб к анализу осуществляли описанным ранее методом «dilute&shoot».

Методом внешнего стандарта была получена градуировочная характеристика для раствора бемитила. Градуировочная характеристика была разделена на три области (5-50 нг/мл; 50-500 нг/мл; 500-1000 нг/мл) ввиду нелинейности зависимости площади пика от концентрации 2-(этилтио)бензимидазола. Все последующие расчеты выполняли на основании полученной зависимости. Результаты представлены на рисунке 1 и в таблице 2.

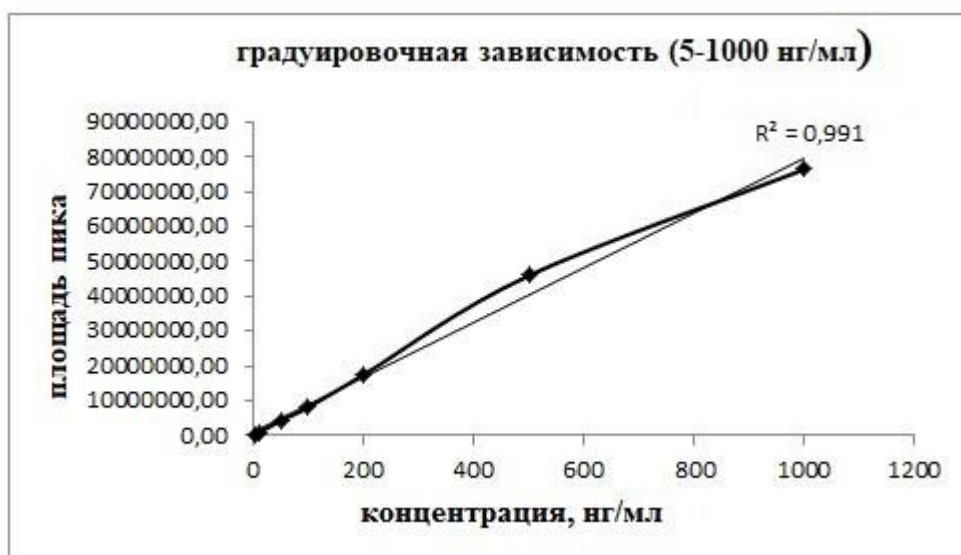


Рисунок 1 - Градуировочная зависимость для определяемого диапазона концентраций.

Таблица 2 - Диапазоны градуировочной зависимости для 2-(этилтио)бензимидазола

Диапазон концентраций, нг/мл	Коэффициент корреляции	Уравнение прямой
5-50	1,0000	$y = 85443x + 58255$
50-500	0,9996	$y = 93286x - 818484$
500-1000	1,0000	$y = 61019x + 2E+07$

Время анализа одной пробы занимает около 12 минут, что обеспечивает высокую пропускную способность лаборатории при анализе большого массива образцов. Нижний предел количественного определения для 2-(этилтио)бензимидазола составляет 5 нг/мл, что соответствует пределу определения, достигнутым в работе [4] для мочи человека.

В таблице 3 приведены выборочные результаты определения количественное содержания 2-(этилтио)бензимидазола в моче крыс в течение курсового приема препарата (сутки 1 – 3) и по его окончании (на 4, 29 сутки). Поскольку прием бемитила может оказывать влияние на содержание креатинина в моче, нормирование концентрации 2-(этилтио)бензимидазола по концентрации креатинина не проводили. По окончании эксперимента (29 суток) нижний предел количественного определения 2-(этилтио)бензимидазола достигнут не был.

Таблица 3. Концентрация бемитила в моче крыс после 3-х кратного курсового введения в ежедневной суточной дозе 25 мг/кг.

Сутки	Концентрация, нг/мл
1*	55±14
2*	132±33
3*	563±150
4	175±30
29	5,2±1,5

*пероральное введение препарата в однократной дозе 25 мг/кг

На рисунке 2 приведен профиль экскреции 2-этилтиобензимидазола после 3-х кратного курсового введения в ежедневной суточной дозе 25 мг/кг.

Наблюдается увеличение содержания 2-(этилтио)бензимидазола в моче вследствие накопления препарата на третьи сутки приема и снижение после окончания приема (на шестые сутки). Еще через сутки (на седьмые сутки) содержание 2-(этилтио)бензимидазола в моче резко падает до следовых количеств с последующими незначительными колебаниями.



Рисунок 2. Концентрация 2-этилтиобензимидазола в моче крыс на протяжении всего эксперимента.

Важным представляется проследить экскрецию метаболитов бемитила с мочой. Ввиду отсутствия образцов сравнения для метаболитов бемитила их содержание в моче ориентировочно оценивалось по площадям пиков с использованием фактора отклика 2-(этилтио)бензимидазола. Для сравнительных оценок также использовали площади пиков аналитов, идентифицированных как метаболиты бемитила. Такая приблизительная оценка позволила установить наиболее обильные и наиболее ретроспективные метаболиты. На рисунке 3 приведен общий вид профилей выведения основных метаболитов 2-(этилтио)бензимидазола с мочой крыс в быстрой фазе элиминации. Ввиду отсутствия образцов сравнения для ориентировочных оценок использованы не концентрации, а площади пиков аналитов. Из графиков видно, что содержание метаболитов в моче крыс достигает максимума на 2 сутки эксперимента. В качестве основных метаболитов можно рассматривать M5 и M4, и, в меньшей степени, продукт ароматического гидроксирования (M2).

Характер выведения одинаков для всех метаболитов. Интенсивность сигнала 2-(этилтио)бензимидазола слишком низкая по сравнению с интенсивностью основных метаболитов, поэтому на графике кривая изменения площади его пика не отображена.

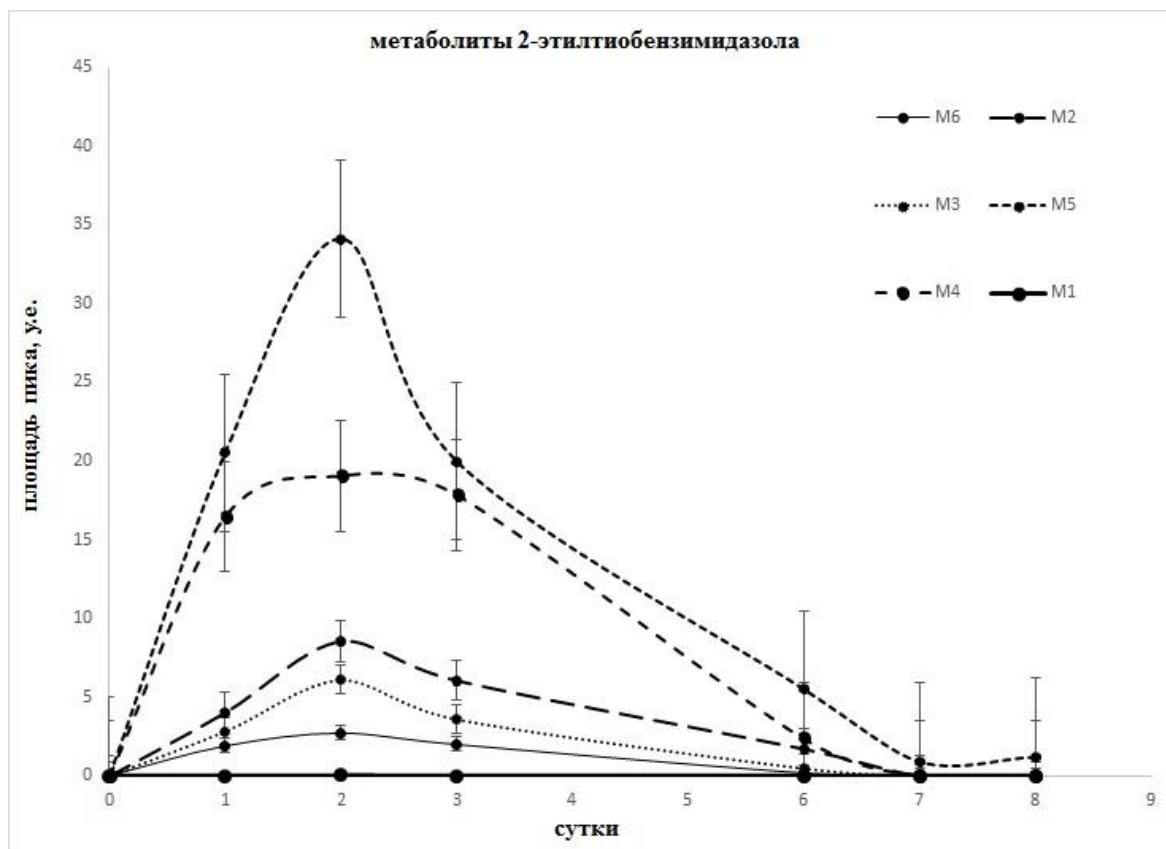


Рисунок 3. Профиль площадей пиков метаболитов 2-(этилтио)бензимидазола в моче крыс на протяжении 8 суток эксперимента (1-е, 2-е и 3-и сутки - пероральное введение в дозе 25 мг/кг, начиная с 4-х суток отмена приема).

Период полного выведения 2-(этилтио)бензимидазола и его основных мочевых метаболитов установлен не был, поскольку на 29 сутки от первого дня курса пределы обнаружения для них достигнуты не были. Сигнал, соответствующий продукту деэтилирования 2-(этилтио)бензимидазола (метаболиту M1), на 7-е сутки снижается до уровня шума. Сигналы остальных метаболитов в моче крыс удавалось регистрировать в течение всего срока наблюдений.

Заключение

Бемитил, присутствующий в водных растворах в форме 2-(этилтио)бензимидазола, быстро метаболизирует в организме крыс. В то же время, нарастание его концентрации в моче в период курсового введения свидетельствует о материальной кумуляции препарата. Всего идентифицировано шесть метаболитов 2-(этилтио)бензимидазола. Из них в наибольших количествах в моче обнаруживаются два: M4 – продукт деэтилирования с последующим присоединением сульфозильной группы и наиболее обильный метаболит M5, которому с высокой степенью вероятности может быть приписана структура аддукта

MEDLINE.RU, ТОМ 21, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 18 МАЯ 2020

2-(этилтио)бензимидазола с ацетилцистеином. Методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием установленных идентификационных характеристик достигается предел определения 2-(этилтио)бензимидазола 5 нг/мл. В рамках этой же процедуры может проводиться идентификация и ориентировочная оценка содержания (в пересчете на бемитил) шести идентифицированных метаболитов.

Литература

1. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Молекулярная фармакология антигипоксантов. СПб.: Изд-во Н-Л, 2004. 368 с.
2. Oliynyk S. Oh S. The Pharmacology of Actoprotectors: Practical Application for Improvement of Mental and Physical Performance // BIOMOL THER. 2012. Vol. 20 N. 5. P. 446-456. doi:10.4062/biomolther.2012.20.5.446
3. Курпякова А.Ф., Гейбо Д.С., Быков В.Н., Никифоров А.С. Особенности фармакокинетики бемитила при ингаляционном введении // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014. Т. 77, № 4. С. 25-28. doi: 10.30906/0869-2092-2014-77-4-25-28
4. Kwiatkowska D., Kowalczyk K., Grucza K., Szutowski M., Bulska E., Wicka M. Detection of bemetil and its metabolite in urine by means of LC-MS/MS in view of doping control analysis // Drug Test Anal. 2018. Vol. 10, N. 11-12. P. 1682-1688. doi: 10.1002/dta.2524

References

1. Zarubina I.V., Shabanov P.D. Molecular pharmacology of antihypoxants. SPb.: Izdat. N-L = SPb.: publishing house N-L, 2004. 368 p. [in Russian].
 2. Oliynyk S. Oh S. The Pharmacology of Actoprotectors: Practical Application for Improvement of Mental and Physical Performance // BIOMOL THER. 2012. Vol. 20 N. 5. P. 446-456. doi:10.4062/biomolther.2012.20.5.446
 3. Kurpyakova A.F., Geibo D.S., Bykov V.N., Nikiforov A.S. Pharmacokinetics features of bemithyl during inhalation // Experimental and clinical pharmacology. 2014. Vol. 77, N. 4. P. 25-28. doi: 10.30906/0869-2092-2014-77-4-25-28. [in Russian].
 4. Kwiatkowska D., Kowalczyk K., Grucza K., Szutowski M., Bulska E., Wicka M. Detection of bemetil and its metabolite in urine by means of LC-MS/MS in view of doping control analysis // Drug Test Anal. 2018. Vol. 10, N. 11-12. P. 1682-1688. doi: 10.1002/dta.2524.
-