

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

© Коллектив авторов, 2006

А. А. Прокопов, Л. В. Шукиль, А. С. Берлянд

## ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ФЕНОЗАН-КИСЛОТЫ В ОРГАНИЗМЕ КРОЛИКОВ

Московский государственный медико-стоматологический университет

Изучен метаболизм нового антиоксидантного средства — фенозан-кислоты. Основными направлениями биотрансформации фенозан-кислоты у кроликов являются окисление бензольного кольца и дегидрирование фрагмента пропионовой кислоты, в результате чего образуются 2,6-ди-*трет*-бутил-*n*-бензохинон и метиловый эфир 4-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутилфенилкоричной кислоты соответственно. Структура метаболитов установлена методом хроматомасс-спектрометрии и подтверждена встречным синтезом.

Фенозан-кислота (4-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутилфенилпропионовая кислота, ФК) обладает ярко выраженными свойствами биоантиоксиданта, причем ее антиоксидантная активность приблизительно в два раза больше, чем у известного антиоксиданта — дибурола [1].

Ранее нами была изучена экспериментальная фармакокинетика ФК и ее калиевой соли феноксана у кроликов.

Целью настоящей работы является изучение метаболизма фенозан-кислоты при ее пероральном введении кроликам в дозе 100 мг/кг. Опыты проводили на кроликах-самцах массой  $2,0 \pm 0,2$  кг. Перед началом эксперимента кролики не получали пищи в течение 14 ч до введения препарата.

Экстракцию и обработку биологических проб проводили по методике [2]. Для этого к 1 мл суточной мочи после перорального введения ФК добавляли 1 мл 0,1 М раствора HCl и трижды экстрагировали ФК из биопробы встряхиванием с 2,5 мл эфира в течение 3 мин. После каждой экстракции смесь центрифугировали в течение 3 мин при 3000 об/мин. Эфирные экстракты объединяли и упаривали досуха в токе азота при температуре не выше 40° С. К сухому остатку прибавляли эфирный раствор диазометана с целью превращения ФК в ее метиловый эфир [2] и после окончания дериватизации эфир отгоняли, после чего высушенный остаток растворяли в метаноле и хроматографи-

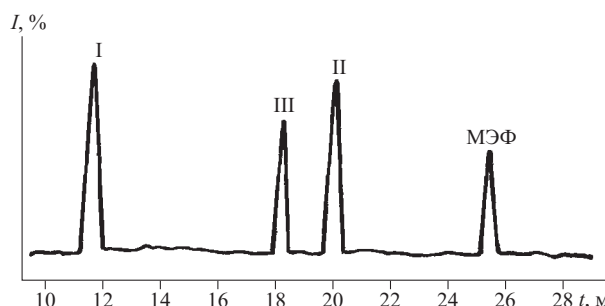
ровали. Аналогично обрабатывали суточную нативную мочу кроликов.

Хроматомасс-спектрометрический анализ метанольных растворов сухих остатков после упаривания эфирных экстрактов суточной мочи кроликов до и после введения ФК и метанольных растворов предполагаемых метаболитов ФК проводили на хроматомасс-спектрометре Hewlett-Packard 5980 (серия 11) в составе системы, состоящей из масс-селективного детектора (МСД) HP 5971 A и станции обработки данных HP 59970 C. Хроматографическое разделение компонентов осуществляли на стеклянной капиллярной колонке со стационарной фазой HP-1 длиной 12 м при скорости газа-носителя (гелий) 1 мл/мин. Температурный режим колонки: 75 °С в течение 2 мин после ввода пробы, затем температуру увеличивали со скоростью 5 град/мин до 160 °С, выдерживали 2 мин и вновь увеличивали температуру со скоростью 2 град/мин до 170 °С, выдерживали при этой температуре 1 мин, а затем доводили до 280 °С со скоростью 20 град/мин.

МСД соединен с капиллярной колонкой интерфейсом прямого ввода. Температура интерфейса 280 °С. МСД работает по принципу ионизации электронным

### Масс-спектры метаболитов фенозан-кислоты

Соединение	Время удерживания, мин	Значения $m/z$ (интенсивность пиков в % от максимального)
I	11,9	220(30), 177(100), 135(20), 91(21), 67(60)
II	20,2	290(30), 275(100), 217(30), 201(23), 57(60)
III	18,7	261(14), 233(25), 220(32), 217(48), 205(84), 189(44), 175(54), 91(20), 57(100), 55(80)



Газо-жидкостная хроматограмма суммы метаболитов фенозан-кислоты после перорального введения кроликам; I — 2,6-ди-*трет*-бутил-*n*-бензохинон; II — метиловый эфир 4-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутилфенилкоричной кислоты; III — предполагаемый метаболит; МЭФ — метиловый эфир фенозан-кислоты

ударом (энергия электронов 70 эВ). Разделение ионов по величине отношения массы к заряду  $m/z$  осуществлялось в квадрупольном анализаторе масс.

В максимумах хроматографических пиков определяли времена удерживания и регистрировали масс-спектры, очищенные от наложения фона.

На рисунке представлена типичная газо-жидкостная хроматограмма суммы метаболитов ФК после ее перорального введения, а в таблице — масс-спектральные характеристики обнаруженных метаболитов.

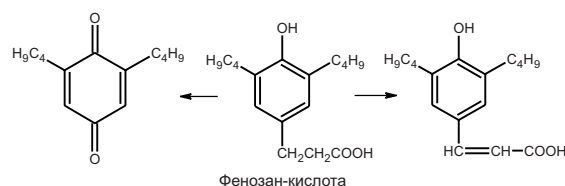
Газо-жидкостная хроматограмма суммы метаболитов ФК содержит 4 основных пика, при этом масс-спектр вещества со временем удерживания 25,4 мин полностью совпадает с масс-спектром метилового эфира ФК.

Масс-спектр интенсивного пика соединения I со временем удерживания 11,9 мин, снятый на вершине этого пика, полностью соответствует масс-спектру синтезированного 2,6-ди-*tert*-бутил-*p*-бензохинона.

Обращает на себя внимание пик соединения II со временем удерживания 20,2 мин. Масс-спектр этого соединения идентичен масс-спектру синтезированного соединения — метилового эфира 4-гидрокси-3,5-ди-*tert*-бутилфенилкоричной кислоты.

Масс-спектр, снятый на вершине пика соединения III со временем удерживания 18,7 мин, принадлежит пока не идентифицированному метаболиту ФК.

Таким образом, метаболизм фенозан-кислоты в организме кроликов при пероральном введении в первом приближении может быть представлен схемой, включающей в себя параллельно идущие процессы образования хиноидной структуры в результате окисления бензольного кольца и дегидрирование фрагмента пропионовой кислоты:



## ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Ершов, Г. А. Никифоров, А. А. Володькин, *Пространственно-затрудненные фенолы*, Химия, Москва (1972).
2. А. А. Прокопов, А. С. Берлянд, Н. В. Веселовская и др., *Хим.-фарм. журн.*, **34**(5), 49 – 51 (2000).

Поступила 08.02.05

## STUDYING PHENOZAN ACID METABOLISM IN RABBIT

A. A. Prokopov, L. V. Shukil', and A. S. Berlyand

Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

Metabolism of the new antioxidant agent phenozan acid was studied in rabbit. The main stages of this process are the oxidation of benzene ring and dehydration of propionic acid fragment with the formation of 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-benzoquinone and 4-hydroxy-3,5-di-*tert*-butylphenylacrylic acid methyl ether. The structures of metabolites were established by computer-aided gas chromatography – mass spectrometry system and checked by direct synthesis.