

ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ ИЗУЧЕНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ТРИМЕБУТИНА

О.С.Брюшинина¹, Р.В.Гурто¹, М.А.Соловьев¹, Е.В.Бородулина¹,
О.Ю.Трифонова¹, Т.Д.Гриднева¹, В.В.Удут^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д.Гольдберга,
634028, г. Томск, просп. Ленина, 3

²Национальный исследовательский Томский государственный университет,
634050, г. Томск, просп. Ленина, 36.

РЕЗЮМЕ

Определение фармакокинетики активно метаболизируемых лекарственных средств представляет ключевую проблему оценки их биодоступности. В работе на примере тримебутин представлены возможные пути решения этой проблемы. В эксперименте *in vitro* на оригинальной метаболической модели раствора гомогената печени определяли концентрацию активного метаболита тримебутин как разницу концентрации тримебутин в растворе до и после его инкубации. С использованием технологии LS-MS детектирования определен масс-спектр основного иона тримебутин (388 m/z) и масс-спектр основного иона метаболита тримебутин (370,3 m/z). Калибровочная зависимость (коэффициент корреляции 0,988), которую использовали для определения основного метаболита тримебутин, была построена по его иону с масс-спектром 370,3 m/z. Представлена новая методика количественного определения основного метаболита тримебутин – N-монодесметил тримебутин с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии, позволившая в эксперименте на кроликах адекватно оценивать фармакокинетику различных форм лекарственного средства.

Ключевые слова: фармакокинетика, тримебутин, N-монодесметил тримебутин, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия.

SUMMARY

PROBLEMATIC ISSUES OF STUDYING THE PHARMACOKINETICS OF TRIMEBUTINE

O.S.Brushinina¹, R.V.Gurto¹, M.A.Solovyev¹,
E.V.Borodulina¹, O.Yu.Trifonova¹,
T.D.Gridneva¹, V.V.Udut^{1,2}

¹E.D.Goldberg Research Institute of Pharmacology and
Regenerative Medicine, 3 Lenina Ave., Tomsk,
634028, Russian Federation

²Tomsk State University, 36 Lenina Ave., Tomsk,
634050, Russian Federation

Determination of pharmacokinetics of actively metabolized drugs is a key problem of assessing their bioavailability. Taking trimebutine as an example, possible solutions to this problem are presented in the work. In the experiment *in vitro* at the original model solution metabolic liver homogenate was determined by the concentration of the active metabolite of trimebutine concentration as the difference in the solution be-

fore and after incubation. By using the technology of detecting LS-MS mass-spectrum basic ion trimebutine (388 m/z) and mass-spectrum of the main metabolite of trimebutine ion (370.3 m/z) were identified. The calibration dependence (correlation coefficient 0.988), which was used to determine the main metabolite of trimebutine, was created on its ion mass-spectrum with 370.3 m/z. There was described a new method for the quantitative determination of the major metabolite of trimebutine – N-monodesmethyl trimebutine using liquid chromatography-mass spectrometry, which allowed to assess adequately on rabbits the pharmacokinetics of various forms of the medication in the experiment.

Key words: pharmacokinetics, trimebutine, N-monodesmethyl trimebutine, high performance liquid chromatography, mass-spectrometry.

Тримебутин – уникальное спазмолитическое средство, восстанавливающее нормальную физиологическую активность мускулатуры кишечника на всем его протяжении при различных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, связанных с нарушениями моторики. Согласно справочным данным тримебутин, после приема внутрь, быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта, максимальная концентрация в плазме крови (C_{max}) достигается через 1-2 часа. Стандартный режим дозирования препарата 3 раза в день [4, 5], служит, для повышения комплаентности, основанием создания пролонгированных форм лекарственного средства. В связи с этим актуальной является задача по разработке лекарственной формы тримебутин с замедленным высвобождением. Немаловажен и тот факт, что для тримебутин ярко выражен эффект первого прохождения через печень, с образованием активного метаболита N-монодесметил тримебутин (N-TMB) [7].

С учетом вышесказанного, не принимая во внимание исторические данные о фармакокинетике собственно тримебутин, нами, в эксперименте, предпринята попытка оценки фармакокинетики различных его лекарственных форм.

Материалы и методы исследования

В исследовании применяли официальный лекарственный препарат, содержащий 200 мг тримебутин (R) и его новую форму – таблетки, покрытые пленочной оболочкой, содержащие 300 мг тримебутин (T) и позиционируемую как препарат пролонгированного действия. При пероральном приеме обеих лекарственных форм тримебутин через 0,5 часа, при приеме препарата в форме R, тримебутин определялся в очень низ-

ких концентрациях, близких к пределу детектирования, а через 0,75 часа не определялся вообще. Для формы Т, даже спустя 0,5 часа после приема, тримебутин не обнаруживался. Этот эксперимент подтвердил данные об эффекте активного печеночного метаболизма лекарственного средства, что определило необходимость изучения фармакокинетики тримебутина по основному активному метаболиту – N-монодесметил тримебутина (N-TMB). Для обнаружения, идентификации и последующего количественного анализа метаболита тримебутина – N-TMB в плазме крови животных была проведена серия экспериментов *in vitro* [6]. Эксперименты по моделированию метаболических процессов были выполнены с использованием гомогената печени интактных крыс-самцов [1].

В подготовленные, маркированные пластиковые пробирки добавляли 1 мл среды инкубации и гомогенат печени крыс (250 мкл), затем добавляли известное количество тримебутина (50, 180, 220, 550, 4000 и 8000 нг), растворенного в 10 мкл 30% ацетонитрила. Содержимое тщательно перемешивали и инкубировали в течение 60 минут при температуре 37°C. После чего в пробирки добавляли 4 мл ацетонитрила, перемешивали, затем пробирки центрифугировали при 5000 g 10 минут. Супернатант отбирали, фильтровали через фильтры типа Millipore с диаметром пор 0,22 мкм, аликвоту – 10 мкл использовали для хроматографического анализа. Концентрацию N-TMB в растворе определяли как разницу концентраций тримебутина в растворе, содержащем гомогенат печени до инкубации и после инкубации. Соотношение площади пика N-TMB на хроматограмме и его расчетной концентрации использовали для построения калибровочной зависимости. Высокая селективность и чувствительность методики, а также широкий линейный диапазон калибровочной зависимости подтверждает, что разработанный метод LC-MS может быть использован для количественного определения метаболита в плазме крови животных.

Фармакокинетическое исследование проводили на лабораторных кроликах-самках. Дизайн исследования – открытая рандомизированная перекрестная схема. Перед началом введения препаратов у кроликов из ушной вены забирали пробы крови для получения интактной плазмы. После этого животных разделяли на две группы. Одной группе кроликов вводили препарат Т, другой – R. Препараты вводили с помощью зонда однократно внутривенно, не нарушая целостности таблетированной формы. Забор проб крови у кроликов осуществляли через 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 12 ч. после введения препарата. Через 7 дней эксперимент повторяли, меняя препараты в группах. Из полученных образцов крови получали плазму, отбирали ее в стерильные пластмассовые пробирки, маркировали, замораживали и хранили при температуре -20°C до момента анализа. Образцы плазмы, подготовленные для анализа, размораживали при комнатной температуре. В пластиковые пробирки добавляли 200 мкл плазмы и 600 мкл ацетонитрила. Содержимое пробирок тщательно перемешивали в течение 10 минут, после чего

центрифугировали при 5000 g 10 минут. Супернатант отбирали, фильтровали через фильтры типа Millipore с диаметром пор 0,22 мкм, аликвоту – 5 мкл использовали для хроматографического анализа.

Для идентификации и количественного анализа использовали масс-спектрометрический детектор. Состав аналитической LS-MS системы: насос высокого давления для подачи подвижной фазы Shimadzu LC-20AD, автоинжектор Shimadzu SIL-20A, колонка аналитическая Perfect Bond ODS-HD HPLC-column 5 μ m 250 \times 3,0 mm с предколоночным картриджем, термостат колонок Shimadzu CTO-20A, жидкостный хромато-масс-спектрометр Shimadzu LCMS-2020 с двойным источником ионизации для LCMS-2020 и программное обеспечение Lab Sol LCMS V5 LCMS2020 system pack.

Подвижная фаза: 70% ацетонитрил и 30% 1 ммоль/л ацетата аммония (v/v). Скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Источник ионизации работал в режиме ортогонального интерфейса ESI, напряжение ионизации 4,5 кВ, в режиме Positive. Температура линии десольватации 250°C. Температура блока нагрева 400°C. Подача осушающего газа (азот) 15 л/мин. Масс спектр тримебутина, полученный в режиме сканирования при анализе раствора стандарта представлен на рисунке 1. Масса основного иона тримебутина – 388 m/z. При анализе образцов, полученных в серии экспериментов *in vitro*, в режиме сканирования масс в диапазоне 320–390 m/z (ожидаемый диапазон для массы метаболита тримебутина) был обнаружен основной ион с массой 370,3 m/z. Масс спектр полученного метаболита приведен на рисунке 2. Используя ион с массой 370,3 m/z, была построена калибровочная зависимость (коэффициент корреляции 0,988), которую использовали при определении концентрации N-TMB в плазме кроликов. В таблице 1 представлены характеристики метода анализа N-TMB тримебутина.

Фармакокинетические показатели изучаемых препаратов рассчитывали модельно-независимым методом статистических моментов.

Результаты исследования и их обсуждение

С помощью разработанной методики количественного анализа были определены концентрации N-TMB в плазме крови кроликов, с учетом временных точек забора, в группах животных, получавших однократно внутривенно исследуемый препарат Т и R. Расчетные значения концентраций тримебутина по N-TMB приведены в таблице 2.

На основании данных количественного определения значений концентраций N-TMB в плазме крови животных, в различные моменты времени после однократного перорального введения препаратов Т и R, были проведены расчеты их фармакокинетических параметров. В результате были получены данные о максимальной концентрации (C_{max}) и времени ее достижения (T_{max}), площади под фармакокинетической кривой (AUC_{0-t}), отражающей количество активного метаболита препарата, циркулировавшего в крови за период его поступления в организм и выведения до уровня концентрации, ниже минимально определяе-

мой, и период полувыведения ($T_{1/2}$). Также были рассчитаны параметры, характеризующие скорость выведения метаболита препарата из организма – общий

клиренс (Cl) и константа скорости элиминации (k_{el}) [2, 3]. Для оценки скорости всасывания обоих препаратов рассчитывали отношение C_{max}/AUC_{0-t} .

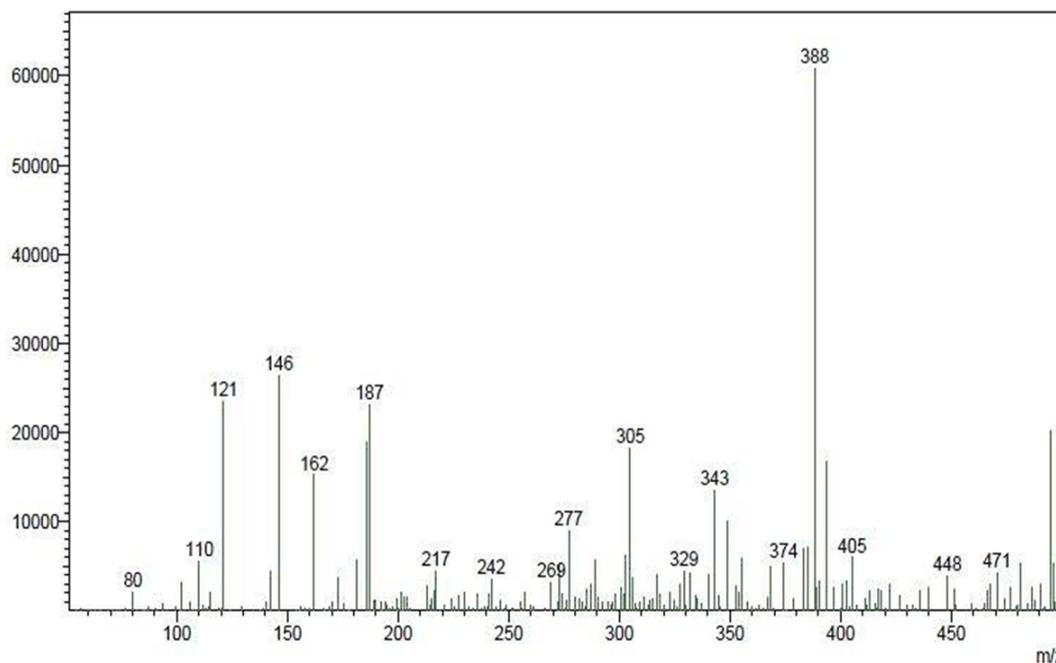


Рис. 1. Масс спектр стандартного раствора тримебутина. Основной ион тримебутина – 388 m/z.

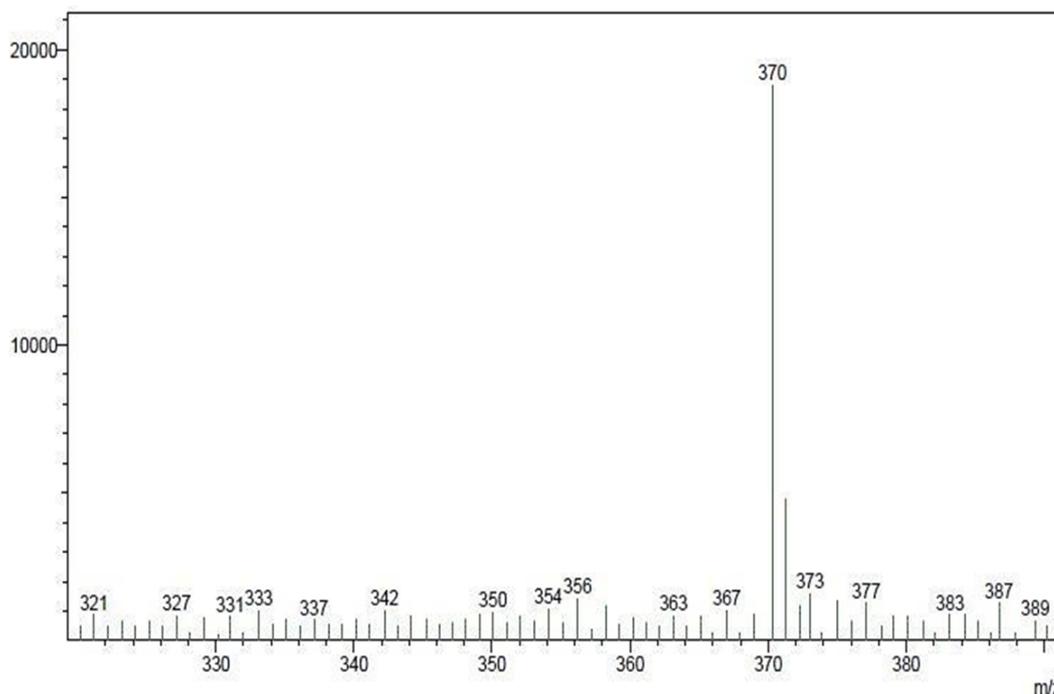


Рис. 2. Масс спектр метаболита тримебутина. Основной ион метаболита тримебутина – 370,3 m/z.

Таблица 1

Хроматографические характеристики метода анализа тримебутина

Параметр	Значение
Объем удерживания	2500 мкл
Асимметрия пика	1,2
Чувствительность метода	10 нг/мл
Линейность метода	50-8000 нг/мл
Нижний предел количественного определения	50 нг/мл

Таблица 2

Фармакокинетические параметры метаболита тримебутина после приема исследуемого препарата Т и R

		1	2	3	4	5	6	Mean	SD	CV%
T	C_{max} , нг/мл	7455,11	7820,45	6205,59	5620,35	7166,95	6814,19	6847,11	816,94	11,93
R		5996,24	3450,41	4700,4	4894,52	4113,49	5234,17	4731,54	883,51	18,67
T	AUC_{0-t} , нг*ч/мл	27299,5	25877,7	23169,4	24161,4	28062,7	24734,3	25550,83	1883,79	7,37
R		22866,4	17210,7	18070,3	20682,4	17049,6	19939,9	19303,23	2279,56	11,81
T	C_{max}/AUC_{0-t}	0,27309	0,30221	0,26784	0,23262	0,25539	0,2755	0,267775	0,023078	8,62
R		0,26223	0,20048	0,26012	0,23665	0,24127	0,2625	0,24388	0,024041	9,86
T	T_{max}	4	3	3	3	3	3	3,17	0,41	12,89
R		2	2	2	2	2	2	2,00	0,00	0,00
T	MRT, ч	4,412	4,185	4,054	3,796	4,22	3,986	4,11	0,21	5,17
R		3,407	3,459	3,301	3,221	3,368	3,277	3,34	0,09	2,65
T	k_e , ч ⁻¹	0,23	0,24	0,25	0,26	0,24	0,25	0,24	0,01	5,21
R		0,29	0,29	0,30	0,31	0,30	0,31	0,30	0,01	2,65
T	Cl, л/мин	0,12	0,19	0,22	0,21	0,18	0,20	0,19	0,03	18,25
R		0,22	0,29	0,28	0,24	0,29	0,25	0,26	0,03	11,35
T	V_d , л	32,32	48,52	52,49	47,13	45,11	48,35	45,65	6,96	15,25
R		44,70	60,29	54,80	46,72	59,26	49,30	52,51	6,58	12,52
T	$T_{1/2}$, час	3,06	2,90	2,81	2,63	2,92	2,76	2,85	0,15	5,17
R		2,36	2,40	2,29	2,23	2,33	2,27	2,31	0,06	2,65

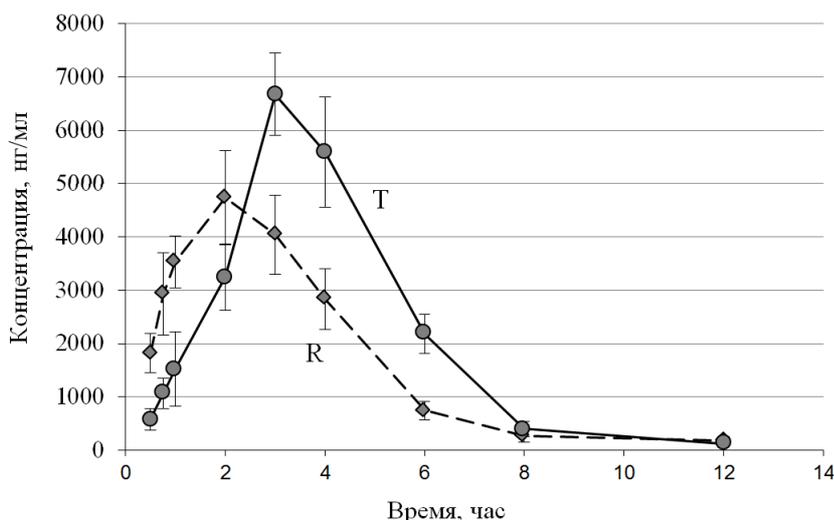


Рис. 3. Усредненные фармакокинетические кривые метаболита тримебутина в плазме крови кроликов после приема исследуемого препарата Т и R.

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров активного метаболита исследуемого препарата Т и препарата R показал, что препараты быстро всасываются из желудочно-кишечного тракта, при этом скорость всасывания различна. Так параметр, характеризующий скорость всасывания C_{max}/AUC_{0-t} для Т составил 0,27 и для R – 0,24 ч⁻¹, а время достижения

максимальной концентрации (t_{max}) составило в среднем для Т – 3,17 и для R – 2,00 ч, соответственно. При этом максимальная концентрация N-TMB, определяемая в плазме крови животных (C_{max}), составила для препарата Т – 6,85 мкг/мл и для R – 4,73 мкг/мл. Усредненные фармакокинетические кривые активного метаболита тримебутина в плазме крови кроликов

после приема исследуемого препарата, в форме Т и R приведены на рисунке 3.

Анализ основного параметра, характеризующего степень и скорость биодоступности действующего вещества из лекарственной формы – AUC_{0-t} , указывает на вариабельность данного параметра не выше 12%. Среднее значение AUC_{0-t} для препарата Т составило 25,0 и для R – 19,3 мкг/мл*ч. Период полувыведения, рассчитанный для исследуемого препарата Т, составил 2,85 часа, а для препарата R – 2,31 часа. Параметр, характеризующий скорость выведения метаболита из организма – общий клиренс Cl, для препарата Т составил 0,19 л/мин, а для R – 0,26 л/мин. При этом выявлены статистически значимые различия по изучаемым показателям для сравниваемых параметров.

Таким образом, в результате исследования было показано, что для препарата Т, позиционируемого, как лекарственная форма с пролонгированным действием, характерно более медленное всасывание и более длительная циркуляция активного метаболита в плазме крови животных в сравнении с официальным препаратом R, что указывает на тормозящие всасывания эффекты разработанной пленочной оболочки и возможную некоторую пролонгацию терапевтического действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фармакологическая коррекция негативного влияния ацетилсалициловой кислоты на систему энергопродукции / О.С.Брюшнина [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2010. Т.150, №9. С.305–309.
2. Фармакокинетика / Н.Н.Каркищенко [и др.]. Ростов-на-Дону: Феникс, 2001. 384 с.
3. Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение. М.: РАМН, 2003. 208 с.
4. Тримебутин – инструкция по применению. Регистр Лекарственных средств России 2000-2014 г. URL: http://www.rlsnet.ru/tn_index_id_39598.htm (дата обращения: 06.10.2014).
5. Тропская Н.С., Попова Т.С. Тримебутин в коррек-

ции нарушений электрической активности органов ЖКТ при экспериментальной эндотоксемии // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. 2009. Т.19, №2. С.37–42.

6. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. 832 с.

7. Pharmacological properties of trimebutine and N-monodesmethyltrimebutine / F.J.Roman [et al.]. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999. Vol.289, №3. P.1391–1397.

REFERENCES

1. Brushnina O.S., Gurto R.V., Slepichev V.A., Stykov G.A., Zyuz'kova Yu.G., Yanovskaya E.A., Udut V.V. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* 2010; 150(9):305–309.
2. Karkishchenko N.N., Khoron'ko V.V., Sergeeva S.A., Karkishchenko V.N. *Farmakokinetika* [Pharmacokinetics]. Rostov-na-Donu: Feniks; 2001.
3. Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. *Prikladnaya farmakokinetika: osnovnye polozheniya i klinicheskoe primeneniye* [Applied pharmacokinetics: foundation and clinical application]. Moscow: RAMN; 2003.
4. *Trimebutin – instruktsiya po primeneniyu. Registr Lekarstvennykh sredstv Rossii 2000-2014 g.* [Trimebutine – patient information leaflet. The register of medicaments of Russia 2000-2014]. Available at: www.rlsnet.ru/tn_index_id_39598.htm
5. Tropskaya N.S., Popova T.S. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii* 2009; 19(2):37–42.
6. Khabriev R.U. *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv* [The manual on experimental (pre-clinical) study of new pharmacological substances.]. Moscow: Meditsina; 2005.
7. Roman F.J., Lanet S., Hamon J., Brunelle G., Maurin A., Champeroux P., Richard S., Alessandri N., Gola M. Pharmacological properties of trimebutine and N-monodesmethyltrimebutine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 289(3):1391–1397.

Поступила 07.11.2014

Контактная информация

Владимир Васильевич Удут,

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор,
руководитель лаборатории физиологии, молекулярной и клинической фармакологии,
НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д.Гольдберга,
634028, г. Томск, просп. Ленина 3.

E-mail: udutv@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Vladimir V. Udut,

MD, PhD, Professor, Corresponding member of RAS,
Head of Laboratory of Physiology, Molecular and Clinical Pharmacology,
E.D.Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine,
3 Lenina Ave., Tomsk, 634028, Russian Federation.

E-mail: udutv@mail.ru