

УДК 543.51+543.54:615.076



Изучение биотрансформации нового селективного ингибитора карбоангидразы II 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида

А.Л. Хохлов¹, И.И. Яичков^{1,2}, А.А. Шетнев², С.А. Ивановский²,
М.К. Корсаков², О.А. Гасилина², Н.Н. Вольхин², С.С. Петухов^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского», 150030, Россия, г. Ярославль, ул. Технопарковая, д. 11/2

E-mail: i.yaichkov@yspu.org

Получена 11.07.2023

После рецензирования 10.08.2023

Принята к печати 28.08.2023

Цель. Определение продуктов биотрансформации нового селективного ингибитора карбоангидразы II – 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида.

Материалы и методы. Исследование проводили на 3 крысах-самцах породы Wistar и 3 кроликах породы Советская шиншилла. Суспензию препарата вводили внутривенным способом крысам в дозировке 20 мг/кг, кроликам – в дозировке 1,6 мг/кг. Образцы крови животных отбирали до введения и через 1, 2, 4 и 24 ч после. У крыс также выполняли забор мочи до введения и в промежутки 0–4, 4–8 и 8–24 ч после. Идентификацию метаболитов в крови, моче и плазме осуществляли с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС. Для хроматографического разделения использовали колонку Poroshell 120EC-C18 (50×3,0 мм, 2,7 мкм) с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C18 (12,5×2,1 мм, 5,0 мкм). Предполагаемые метаболиты синтезировали, подтверждали их структуру методом ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Полученные вещества сопоставляли с идентифицированными в биологических жидкостях веществами по времени удерживания, основным MRM-переходам и масс-спектрам.

Результаты. При анализе проб плазмы, крови и мочи обнаружен N-гидроксиметаболит, образовавшийся путём присоединения атома кислорода к молекуле препарата. Хроматографические пики данного соединения были идентифицированы на MRM-переходах 255→159, 255→117, 255→89 m/z на 7,2 мин анализа. Были синтезированы N-оксид 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида и N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамид, которые потенциально могли быть получены в процессе биотрансформации. В ходе подтверждающих ВЭЖХ-МС/МС-испытаний по совпадению времён удерживания, соотношения площадей пиков на основных MRM-переходах и масс-спектров установлено, что идентифицированный метаболит – N-гидроксипроизводное препарата. Хроматографические пики N-оксида, обнаруженные при анализе модельных смесей стандартного образца на MRM-переходах 255→175, 255→133, 255→89 m/z при времени удерживания 5,43 мин, отсутствовали в образцах животных.

Заключение. Изучаемый препарат метаболизируется с образованием единственного метаболита N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида. Данное соединение обнаружено в свежееотобранных пробах биологических жидкостей обоих видов животных. Структура метаболита подтверждена методом ВЭЖХ-МС/МС путём сравнения с синтезированным стандартным образцом.

Ключевые слова: биотрансформация; идентификация метаболитов; селективный ингибитор карбоангидразы II; ВЭЖХ-МС/МС; N-гидроксисульфонамид

Список сокращений: OXSA – 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамид; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием; ESI – ионизация электрораспылением; MRM – режим мониторинга множественных реакций; MS2 – режим получения масс-спектра молекулярного иона; t_R – время удерживания; DMSO-D6 – дейтерированный диметилсульфоксид; DIPEA – диизопропилэтиламин.

Для цитирования: А.Л. Хохлов, И.И. Яичков, А.А. Шетнев, С.А. Ивановский, М.К. Корсаков, О.А. Гасилина, Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов. Изучение биотрансформации нового селективного ингибитора карбоангидразы II 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида. *Фармация и фармакология*. 2023;11(3):240-254. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-3-240-254

© А.Л. Хохлов, И.И. Яичков, А.А. Шетнев, С.А. Ивановский, М.К. Корсаков, О.А. Гасилина, Н.Н. Вольхин, С.С. Петухов, 2023

For citation: A.L. Khokhlov, I.I. Yaichkov, A.A. Shetnev, S.A. Ivanovskiy, M.K. Korsakov, O.A. Gasilina, N.N. Volkhin, S.S. Petukhov. Study of biotransformation of new selective carbonic anhydrase II inhibitor 4-(2-methyl-1,3-oxazole-5-yl)-benzenesulfonamide. *Pharmacy & Pharmacology*. 2023;11(3):240-254. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-3-240-254

Study of biotransformation of new selective carbonic anhydrase II inhibitor 4-(2-methyl-1,3-oxazole-5-yl)-benzenesulfonamide

A.L. Khokhlov¹, I.I. Yaichkov^{1,2}, A.A. Shetnev², S.A. Ivanovskiy²,
M.K. Korsakov², O.A. Gasilina², N.N. Volkhin², S.S. Petukhov^{1,2}

¹ Yaroslavl State Medical University,
5, Revolutsionnaya Str., Yaroslavl, Russia, 150000

² Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky,
Bldg 2, 11, Technoparkovaya Str., Yaroslavl, Russia, 150030

E-mail: i.yaichkov@yspu.org

Received 11 July 2023

After peer review 10 Aug 2023

Accepted 28 Aug 2023

The aim of the study was to determine biotransformation products of a new selective carbonic anhydrase II inhibitor – 4-(2-methyl-1,3-oxazole-5-yl)-benzenesulfonamide.

Materials and methods. The study was conducted on 3 Wistar rats and 3 rabbits of the Soviet Chinchilla breed. The suspension of the drug was administered intraperitoneally to rats at a dosage of 20 mg/kg, to rabbits - at a dosage of 1.6 mg/kg. The animal blood samples were collected before the administration and 1, 2, 4, 24 h after. Urine sampling was also performed in the rats before the administration and in the intervals of 0–4, 4–8, 8–24 h after. The identification of metabolites in blood, urine and plasma was carried out using HPLC-MS/MS. Poroshell 120 C 18 column (50×3.0 mm, 2.7 μm) with a Zorbax Eclipse Plus C18 pre-column (12.5×2.1 mm, 5.0 μm) was used for the chromatographic separation. The assumed metabolites were synthesized, their structure was confirmed by the NMR spectroscopy method and a high-resolution mass spectrometry. The obtained substances were compared with the substances identified in biological fluids by retention time, the main MRM-transitions and mass spectra.

Results. The N-hydroxymetabolite was revealed in the analyses of plasma, blood and urine samples which had been formed by the addition of an oxygen atom to the drug molecule. Chromatographic peaks of this compound were identified at the MRM-transitions of 255→159, 255→117, 255→89 m/z at the 7.2nd min of the analysis. The N-oxide of 4-(2-methyl-1,3-oxazole-5-yl)-benzenesulfonamide and N-hydroxy-4-(2-methyl-1,3-oxazole-5-yl)-benzenesulfonamide were synthesized; potentially, they could have been obtained during the biotransformation. During the confirmatory HPLC-MS/MS tests based on the coincidence of the retention times, the main MRM transitions and mass spectra, the ratio of the peak areas at the identified metabolite it was established that an N-hydroxy derivative. Chromatographic peaks of the N-oxide detected in the analysis of the model mixtures of the standard substance at the MRM-transitions of 255→175, 255→133, 255→89 m/z at the retention time of 5.43 min, were absent in the animal samples.

Conclusion. The studied drug is metabolized to form a single metabolite of N-hydroxy-4-(2-methyl-1,3-oxazole-5-yl)-benzenesulfonamide. This compound was found in freshly collected samples of biological fluids of both animal species. The structure of the metabolite was confirmed by the HPLC-MS/MS-method by comparison with the synthesized standard substance.

Keywords: biotransformation; metabolite identification; selective carbonic anhydrase II inhibitor; HPLC-MS/MS; N-hydroxysulfonamide

Abbreviations: OXSA – 4-(2-methyl-1,3-oxazole-5-yl)-benzenesulfonamide; HPLC-MS/MS – high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection; ESI – electrospray ionization; MRM – multiple reaction monitoring mode; MS2 – mode for obtaining the mass spectrum of a molecular ion; t_R – retention time; DMSO-D6 – deuterated dimethyl sulfoxide; DIPEA – diisopropylethylamine.

ВВЕДЕНИЕ

Селективные ингибиторы карбоангидразы II широко применяются для терапии открытоугольной глаукомы. Производное бензолсульфонамида – 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамид (OXSA) является новым представителем этой фармакологической группы (Рис. 1). Данное соединение по эффективности снижения внутриглазного давления и продолжительности действия на экспериментальных моделях превосходит ранее разработанные дорзоламид, бринзоламид и ацетазоламид [1–4]. Таким образом, дальнейшее изучение OXSA является перспективным.

Идентификация продуктов метаболизма является важной и обязательной частью доклинических исследований каждого лекарственного препарата¹. Количественное определение данных соединений в биологических средах необходимо для полного изучения фармакокинетики лекарственного средства, включая процесс его элиминации. Кроме того, найденные метаболиты могут обладать большей фармакологической активностью, чем исходное лекарственное вещество [5]. Известны два основных экспериментальных способа определения

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Том 1. – М.: Полиграф-плюс, 2012. – 944 с.

метаболитов. Первый способ – эксперимент с применением микросом *in vitro* [6–8], S9-фракций [9] или культур клеток гепатоцитов человека или животных [10–13]. Второй способ заключается во введении изучаемого препарата лабораторным животным с последующим забором биологического материала через определённые промежутки времени. В качестве подопытных при этом часто выступают грызуны: крысы [14–17] и мыши [18].

Наиболее универсальным аналитическим методом для идентификации метаболитов является ВЭЖХ-МС/МС. Для этих целей применяют гибридные масс-спектрометрические детекторы высокого разрешения на основе «Orbitrap» [7, 10, 15, 16] или времяпролётный анализатора [8, 9, 17] и различные типы ионных ловушек [6, 13, 18]. Также используют наиболее распространённые для фармакокинетических исследований трёхквардупольные масс-спектрометры [11, 19, 20]. Идентификацию метаболитов при этом возможно проводить в MRM-режиме по прогнозируемым MRM-переходам: к значениям m/z молекулярного иона и ионов продуктов изучаемого лекарственного препарата прибавляют или вычитают величину m/z прогнозируемой модификации молекулы [19, 20]. Этот способ обеспечивает более высокую чувствительность по сравнению с панорамным сканированием спектра [21]. После предварительного масс-спектрометрического определения структуры проводится синтез предполагаемых метаболитов и подтверждающий анализ путём сопоставления времени удерживания аналитов, их масс-спектров, соотношения MRM-переходов и других параметров.

Процесс биотрансформации OXSA ранее не был изучен [1–4]. Широко применяемые селективные ингибиторы карбоангидразы II, дорзоламид и бринзоламид, метаболизируются путём деалкилирования. Так, дорзоламид подвержен N-деэтилированию [22], а бринзоламид – O-деметилированию и N-деэтилированию [23, 24]. Ранее разработанный ацетазоламид биотрансформации не подвергался [25]. Близкое по структуре производное арилсульфонамида, гидрохлортиазид, также элиминируется в неизменённом виде [26, 27]. Основными путями метаболизма сульфаниламидных противомикробных препаратов являются N-ацетилирование и N-гидроксилирование ароматической аминогруппы, а также метилирование и гидроксилирование заместителей сульфонамидной и аминогрупп [28, 29]. Известно также образование N-оксидов по ароматическим атомам азота [21]. Таким образом, в ходе метаболизма 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида возможно N-окисление 1,3-оксазольного атома азота и гидроксилирование метильной группы остатка 2-метил-1,3-оксазола. Примеров модификаций сульфонамидной группы в литературных данных не приведено.

ЦЕЛЬ. Идентификация метаболитов нового селективного ингибитора карбоангидразы II – 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоаналитический анализ

Идентификацию продуктов биотрансформации проводили с помощью ВЭЖХ-МС/МС-системы, включающей в себя tandemный масс-спектрометрический детектор AB Sciex QTRAP5500 (AB Sciex, Сингапур) и хроматограф Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), состоящий из насоса G1312B, автосемплера G1329B с термостатом G1330B, термостата колонок G1316A (программное обеспечение «Analyst 1.6.2» (AB Sciex, США); обработка хроматограмм – «MultiQuant 3.0.5» (AB Sciex, США), прогнозирование метаболитов и создание MRM-методов идентификации метаболитов – «LightSight» 2.3 (AB Sciex, США).

Хроматографическое разделение готовых проб проводили на хроматографической колонке Poroshell 120EC-C18 (50×3,0 мм, 2,7 мкм) с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C18 (12,5×2,1 мм, 5,0 мкм). Для градиентного элюирования (табл. 1) использовали подвижную фазу на основе 0,1% водного раствора муравьиной кислоты и метанола. Температура термостата колонок составила 40°C, скорость потока – 400 мкл/мин. Параметры масс-спектрометрического детектора приведены в таблице 2.

При подготовке проб к 50 мкл крови, плазмы или мочи добавляли 200 мкл метанола. Смесь перемешивали на шейкере и центрифугировали (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific, США) 5 мин при 10000 об/мин. Затем 1 мкл надосадочной жидкости вводили в ВЭЖХ-МС/МС систему.

В приведённых выше условия соотношение «сигнал/шум» хроматографического пика OXSA на MRM-переходе 239→159 m/z (контрольный MRM-переход для оценки пригодности системы и контроля введения препарата) при концентрации 1 нг/мл в пробах плазмы, крови и мочи составило не менее 50:1.

Для приготовления модельных смесей к 47,5 мкл биологической жидкости добавляли 2,5 мкл метанольного раствора метаболитов в концентрациях 10 мкг/мл (для концентрации 500 нг/мл) и 200 мкг/мл (для концентрации N-гидроксиметаболита в плазме 10000 нг/мл при изучении стабильности).

Исследование на животных

Исследование биотрансформации 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида проводили на 3 крысах породы Wistar (279,67±30,44 г) и 3 кроликах (2,51±0,32 кг) породы Советская шиншилла, полученных из питомника ООО «СМК Стезар» (Россия). Суспензию OXSA однократно вводили внутрибрюшинным способом крысам в дозировке 20 мг/кг, кроликам – 1,6 мг/кг. Образцы крови отбирали до введения ЛС и через 1, 2, 4 и 24 ч после введения в объёме 0,2 мл в пробирки, содержащие K_3EDTA . Крысы были предварительно катетеризированы в правую яремную вену. У кроликов пробы отбирали из ушной вены с помощью инсулинового шприца (Beijing Fornurse Medical Equipment Co., Ltd, Китай).

После отбора 50 мкл образцы подвергали немедленной пробоподготовке и анализировали. Оставшуюся в пробирке кровь (≈ 150 мкл) центрифугировали в течение 10 мин при 2500 об/мин и температуре $+4^{\circ}\text{C}$ для получения плазмы. У крыс также отбирали пробы мочи (весь объём мочи крысы за указанный промежуток времени) с помощью метаболической клетки до введения (холостая проба) и в промежутки с момента введения до 4, с 4 до 8, с 8 до 24 ч. Мочу также немедленно обрабатывали и анализировали.

Таким образом, на первом этапе у каждого животного отбирали по 5 образцов плазмы и крови (4 экспериментальных и 1 контрольный), и по 4 образца мочи у крыс (3 экспериментальных и 1 контрольный). После синтеза N-гидроксиметаболита спустя 1 мес эксперимент повторяли для подтверждения структуры из-за его нестабильности в биологических пробах и проверки наличия нового возможного метаболита – производного сульфоновой кислоты. В результате в течение 2-х этапов было проанализировано по 30 образцов плазмы (включая 6 контрольных образцов) и по 30 образцов крови обоих видов животных (включая 6 контрольных образцов), а также 24 образца мочи крысы (включая 6 контрольных образцов), что достаточно для надёжной идентификации всех возможных продуктов биотрансформации.

Количественное определение концентрации ЛС и его метаболитов, а также расчёт их фармакокинетических параметров на данном этапе исследования не проводили. Поэтому число животных каждого вида было сокращено до 3 особей – ниже стандартного объёма выборки, исходя из гуманных соображений².

Исследование было одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет» им. К.Д. Ушинского (протокол № 1 от 10.06.2023).

Синтез метаболитов OXSA

После определения возможной структуры метаболита по изменениям MRM-переходов аналита синтезировали N-оксид и N-гидроксиметаболит 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида.

Для синтеза метаболитов были использованы следующие органические, неорганические реагенты и растворители: диизопропилэтиламин ($\geq 98\%$, «Sigma-Aldrich», Германия), ацетонитрил (х.ч., АО «Вектон», Российская Федерация), перекись водорода 50% (техн., ГК «Экрос», Российская Федерация), уксусная кислота ледяная (х.ч., АО «Вектон», Российская Федерация), гидроксилamina гидрохлорид ($\geq 99\%$, АО «Вектон», Российская Федерация). Данные реактивы применяли без дополнительной очистки.

Контроль над протеканием реакций осуществляли методом тонкослойной хроматографии на алюминиевых пластинах «SilufolUV» (10×20 см, Merck Millipore, Германия). На линию старта наносили по 5 мкл 0,5% раствора исходного

реагента в ацетоне и реакционной смеси. Пластинку высушивали и затем помещали в камеру. Разделение осуществляли с использованием в качестве элюента смеси этилацетат: петролейный эфир в соотношении 1:1 (об./об.). При достижении фронтом растворителя высоты 10 см, пластинку вынимали из камеры и высушивали на воздухе. Детектирование проводили при длине волны 254 нм. Реакцию вели до полного исчезновения в реакционной смеси пятна, соответствующего исходному реагенту.

Спектры ЯМР регистрировали на приборе «Varian UNITY Plus – 400» (Varian LLC, США) для растворов ДМСО- d_6 при 25°C . В качестве эталона для отсчёта химических сдвигов были выбраны сигналы остаточных протонов растворителя в ^1H -ЯМР (δ_{H} 2.50 м.д.) или ^{13}C -ЯМР (δ_{C} 39.5 м.д.). Обозначение формы сигналов: с – синглет, д – дублет, т – триплет, к – квартет, д. д – дублет дублетов, т. д – триплет дублетов, м – мультиплет. Температуру плавления определяли на аппарате для определения точки плавления и кипения «Büchi M-560» (Büchi Labortechnik AG, Швейцария). Масс-спектры высокого разрешения получали на масс-спектрометре «Bruker Daltonics MicrOTOF-II» (Bruker Daltonics GmbH, США) методом ионизации (ESI).

Статистическая обработка

Статистические расчёты были выполнены с помощью Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, США). Аналитический сигнал в образцах животных и модельных смесях синтезированного образца сравнивали по времени удерживания (t_{R}), соотношению площадей пиков на основных MRM-переходах. При этом рассчитывали отношение средних арифметических данных параметров в испытуемых и стандартных пробах. Максимальное отклонение t_{R} синтезированной субстанции должно было находиться в пределах $\pm 1\%$ от t_{R} метаболита в пробах животных, максимальное отклонение в соотношении площадей пиков на MRM-переходах – в пределах $\pm 20\%$ от данного соотношения в пробах животных. Данные критерии установлены согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания, применяемым при подтверждении подлинности ЛС методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии ввиду отсутствия иных специальных требований к исследованиям биотрансформации^{3,4}. В качестве меры рассеяния полученных данных в таблицах приведено значение стандартного отклонения (SD). Также рассчитывали процент совпадения масс-спектров стандартного образца и метаболита, зарегистрированных в режиме MS2 («Analyst 1.6.2», AB Sciex, США).

³ Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. ОФС.1.2.1.2.0001 «Хроматография». – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/khromatografiya/>.

⁴ Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. ОФС.1.2.1.1.0008 «Масс-спектрометрия». – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-1-metody-spektralnogo-analiza/mass-spektrometriya/>.

² Там же.

Таблица 1 – Параметры градиентного элюирования метода для идентификации метаболитов ОХСА

Время, мин	А, %	Б, %
0,00	90	10
0,50	90	10
10,00	10	90
15,00	10	90
15,10	90	10
20,00	90	10

Примечание: А – 0,1% водный раствор муравьиной кислоты, Б – 0,1% водный раствор метанола.

Таблица 2 – Параметры масс-спектрометрического детектирования ОХСА и его метаболитов

Параметры	Значение
Способ ионизации	Электрораспылительная ионизация (ESI)
Напряжение электроспрея	+5500 В
Газовая завеса	30 psi (Азот)
CAD-газ (диссоциация, активированная соударением)	High (Азот)
Температура источника ионов	700°C
Газ 1 (Нагревающий газ)	55 psi (Воздух)
Газ 2 (Газ-небулайзер)	55 psi (Воздух)

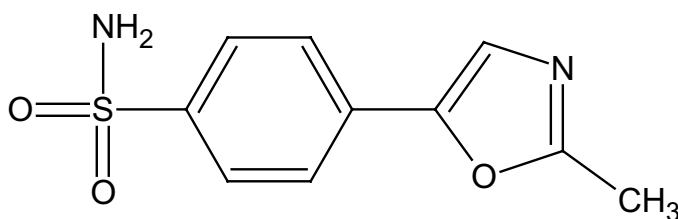


Рисунок 1 – Структурная формула 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида

■ +MS2 (239.00): 48 MCA scans from Sample 1 (TuneSampleID) of MT20180322092351.wiff (Turbo Spray)

Max. 1.5e8 cps.

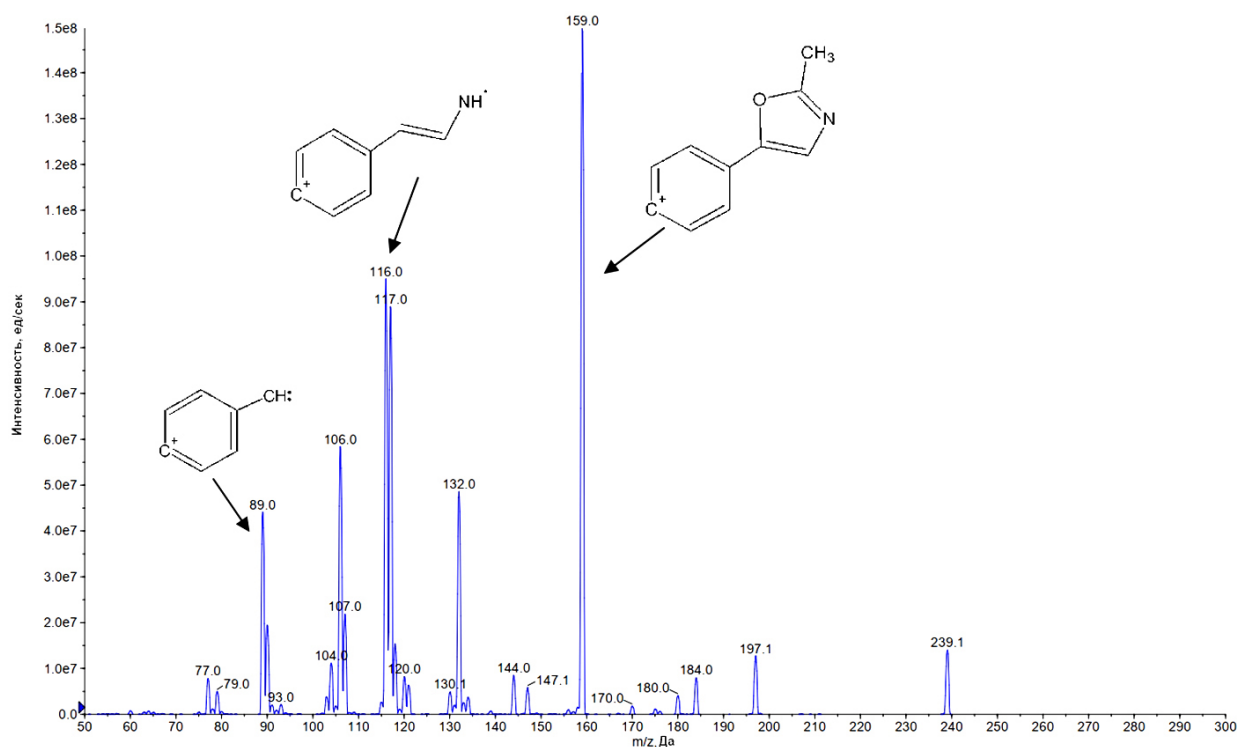


Рисунок 2 – Масс-спектр ОХСА (режим MS2; полярность положительная; CE=40eV)

Таблица 3 – MRM-переходы для идентификации возможных метаболитов

Модификация	Изменение m/z	Прогнозируемые MRM-переходы, m/z
Контрольный (OXSA)	–	239→159
Гидроксилирование / N-окисление (+OH/→O)	+16	255→159; 255→117; 255→89; 255→175; 255→133; 255→105
Метилирование (+CH ₃)	+14	253→159; 253→117; 253→89; 253→173; 253→131; 253→103
Гидроксилирование + N-окисление (+OH+→O)	+32	271→159; 271→117; 271→89; 271→175; 271→133; 271→105; 271→191; 271→149; 271→121
Глюкуроновая конъюгация*	+176	415→159; 415→117; 415→89
Ацетилирование*	+42	281→159; 281→117; 281→89
Сульфирование*	+80	319→159; 319→117; 319→89
Образование сульфоновой кислоты -SO ₂ NH ₂ →-SO ₃ **	+1	240→159; 240→117; 240→89

Примечание: * Различие m/z не прибавлялось к ионам продуктам из-за элиминирования сульфонамидной группы в процессе CAD-фрагментации. ** Анализ проводился только во время подтверждающих испытаний.

Таблица 4 – Результаты идентификации гидроксилированного / N-окисленного метаболита

Образцы	Временная точка	Время удерживания метаболита, мин (Me±SD) ⁵					
		255→159 m/z	255→117 m/z	255→89 m/z	255→175 m/z	255→133 m/z	255→105 m/z
Пробы крысы	Плазма	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		1	7,20±0,01	7,21±0,01	7,20±0,01	N/A	N/A
		2	7,20±0,01	7,21±0,01	7,20±0,01	N/A	N/A
		4	7,20±0,01	7,21±0,01	7,21±0,01	N/A	N/A
		24	7,20±0,02	N/A *	N/A *	N/A	N/A
	Кровь	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		1	7,18±0,01	7,19±0,01	7,19±0,01	N/A	N/A
		2	7,19±0,01	7,19±0,01	7,19±0,01	N/A	N/A
		4	7,20±0,01	7,19±0,01	7,19±0,01	N/A	N/A
		24	7,19±0,01	7,19±0,01	7,19±0,01	N/A	N/A
	Моча	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		0–4	7,19±0,01	7,19±0,01	7,19±0,01	N/A	N/A
		4–8	7,20±0,01	7,19±0,01	7,20±0,01	N/A	N/A
		8–24	7,19±0,01	7,19±0,01	7,19±0,01	N/A	N/A
		24	7,19±0,01	7,19±0,01	7,19±0,01	N/A	N/A
Пробы кролика	Плазма	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		1	7,21±0,02	7,21±0,02	7,20±0,01	N/A	N/A
		2	7,19±0,02	7,19±0,02	7,20±0,01	N/A	N/A
		4	7,20±0,01	7,20±0,01	7,21±0,01	N/A	N/A
		24	7,20±0,01	N/A *	N/A *	N/A	N/A
	Кровь	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		1	7,20±0,01	7,19±0,01	7,19±0,01	N/A	N/A
		2	7,20±0,02	7,20±0,01	7,19±0,01	N/A	N/A
		4	7,19±0,01	7,19±0,01	7,19±0,01	N/A	N/A
		24	7,20±0,01	7,21±0,01	7,20±0,01	N/A	N/A
	Моча	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		0–4	7,19±0,01	7,19±0,01	7,19±0,01	N/A	N/A
		4–8	7,20±0,01	7,19±0,01	7,20±0,01	N/A	N/A
		8–24	7,19±0,01	7,19±0,01	7,19±0,01	N/A	N/A
		24	7,19±0,01	7,19±0,01	7,19±0,01	N/A	N/A
N-оксид OXSA	Кровь	N/A	N/A	5,43±0,01	5,43±0,01	5,43±0,01	N/A
	Плазма	N/A	N/A	5,42±0,01	5,42±0,01	5,42±0,01	N/A
	Моча	N/A	N/A	5,43±0,01	5,43±0,01	5,43±0,01	N/A
N-гидрокси-OXSA	Кровь	7,20±0,01	7,20±0,01	7,20±0,01	N/A	N/A	N/A
	Плазма	7,20±0,01	7,20±0,01	7,20±0,01	N/A	N/A	N/A
	Моча	7,22±0,01	7,21±0,01	7,21±0,01	N/A	N/A	N/A

Примечание: N/A – не обнаружено. * Сигнал аналита отсутствовал из-за низкого содержания OXSA-M1.

⁵ В каждой ячейке таблицы приведено среднее значение t_R , полученное после анализа 3 проб в каждой временной точке.

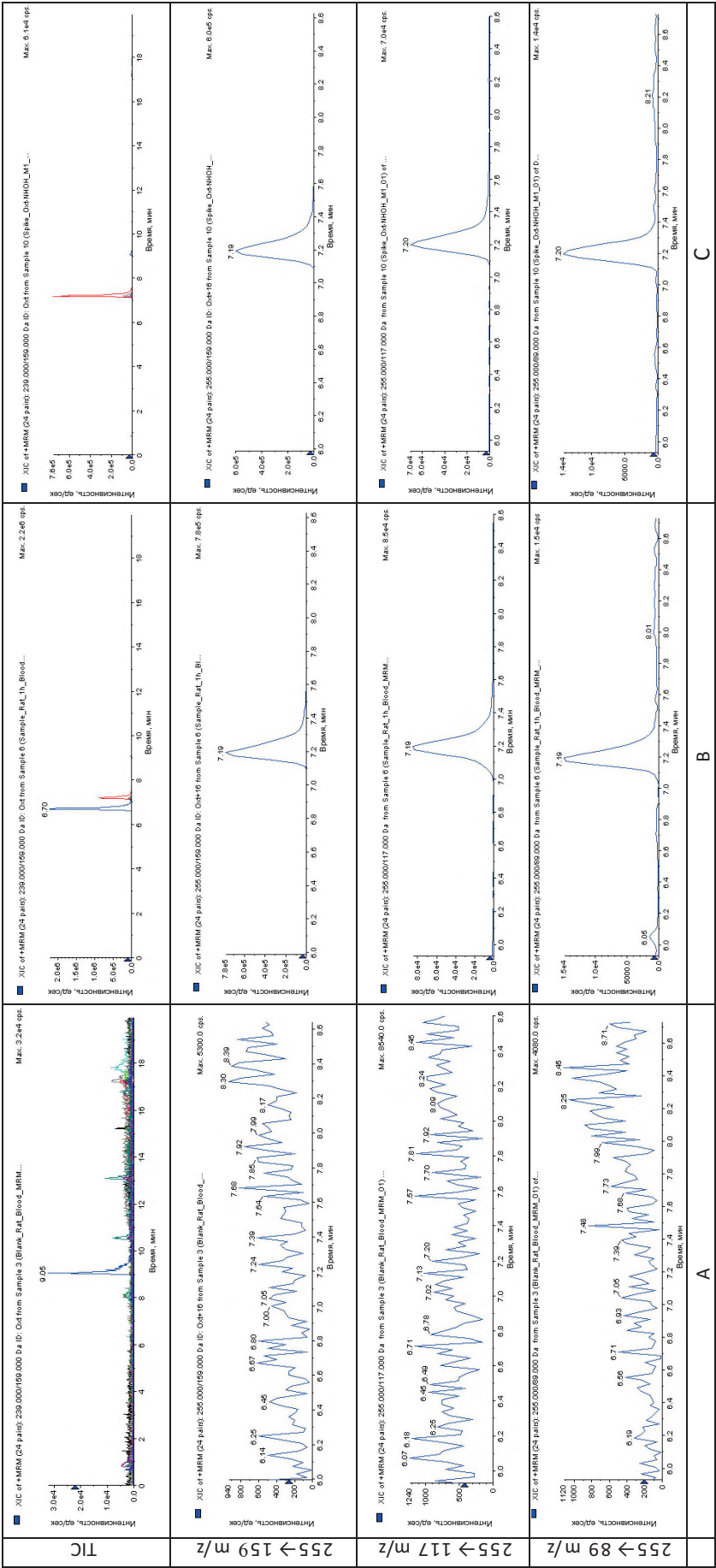


Рисунок 3 – Примеры хроматограмм холостого образца (А – кровь крысы), пробы крысы в точке 1 ч), проба крови с добавкой N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида (В – образец крови крысы с добавкой аналита с концентрацией 500 нг/мл)
Примечание: TIC – хроматограммы всех MRM-переходов (табл. 3).

Таблица 5 – MRM-переходы для идентификации возможных конъюгатов гидроксилированного метаболита

Модификация	Изменение m/z	Прогнозируемые MRM-переходы, m/z
Глюкуроновая конъюгация	+176	431→159; 431→117; 431→89; 431→335; 431→293; 431→265 m/z
Ацетилирование	+42	297→159; 297→117; 297→89; 297→201; 297→131
Сульфирование	+80	335→159; 335→117; 335→89; 335→239; 335→197; 335→169
Метилирование	+14	269→159; 269→117; 269→89; 269→173; 269→131; 269→103

Таблица 6 – Результаты подтверждения структуры основного метаболита OXSA

Параметр		t _R , мин (n=3)	Соотношение площадей пиков 255→117 / 255→159 m/z	Соотношение площадей пиков 255→89 / 255→159 m/z	Совпадение MS2- масс-спектров** (min–max, %)
Пробы плазмы крысы	Отобранные пробы в точках 1, 2, 4 ч (n=9)	7,16±0,01	0,1181±0,0090	0,0231±0,0015	89–95
	Пробы с добавкой (n=3)	7,15±0,01	0,1146±0,0109	0,0220±0,0016	
	% совпадения*	100,08	103,05	105,16	–
Пробы крови крысы	Отобранные пробы в точках 1, 2, 4 ч (n=9)	7,16±0,01	0,1287±0,0112	0,0224±0,0016	95–98
	Пробы с добавкой (n=3)	7,15±0,01	0,1260±0,0082	0,0231±0,0015	
	% совпадения*	100,12	102,14	97,06	–
Пробы мочи крысы	Отобранные пробы в интервалах 0–4, 4–8 ч (n=6)	7,15±0,01	0,1304±0,0146	0,0229±0,0015	91–95
	Пробы с добавкой (n=3)	7,16±0,01	0,1244±0,0081	0,0228±0,0015	
	% совпадения	99,88	104,81	100,51	–
Пробы плазмы кролика	Отобранные пробы в точках 1, 2, 4 ч (n=9)	7,16±0,01	0,1232±0,0116	0,0229±0,0015	90–93
	Пробы с добавкой (n=3)	7,16±0,01	0,1250±0,0145	0,0227±0,0017	
	% совпадения	100,09	98,53	100,54	–
Пробы крови кролика	Отобранные пробы в точках 1, 2, 4 ч (n=9)	7,16±0,01	0,1244±0,0105	0,0225±0,0012	93–97
	Пробы с добавкой (n=3)	7,15±0,02	0,1287±0,0119	0,0245±0,0012	
	% совпадения	99,80	96,65	91,75	–

Примечание: * Соотношение средних значений; ** Точки 1 ч и интервал 0–4 ч после введения (n=3).

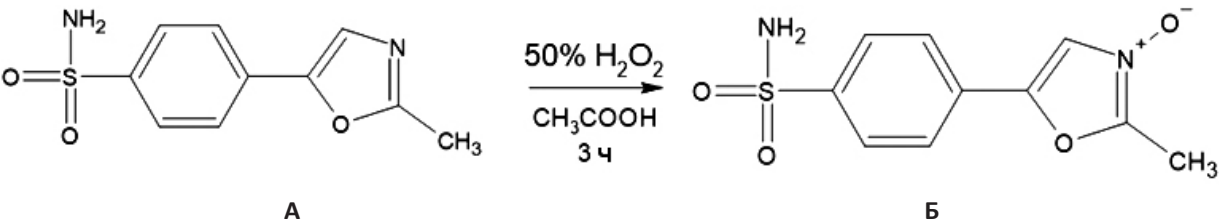
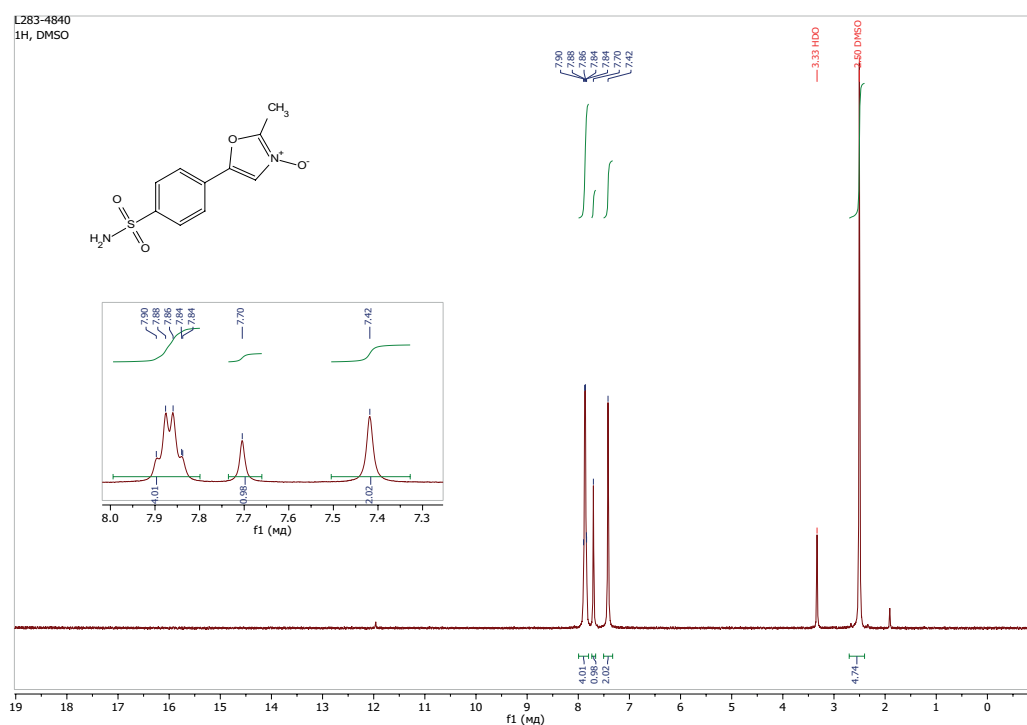
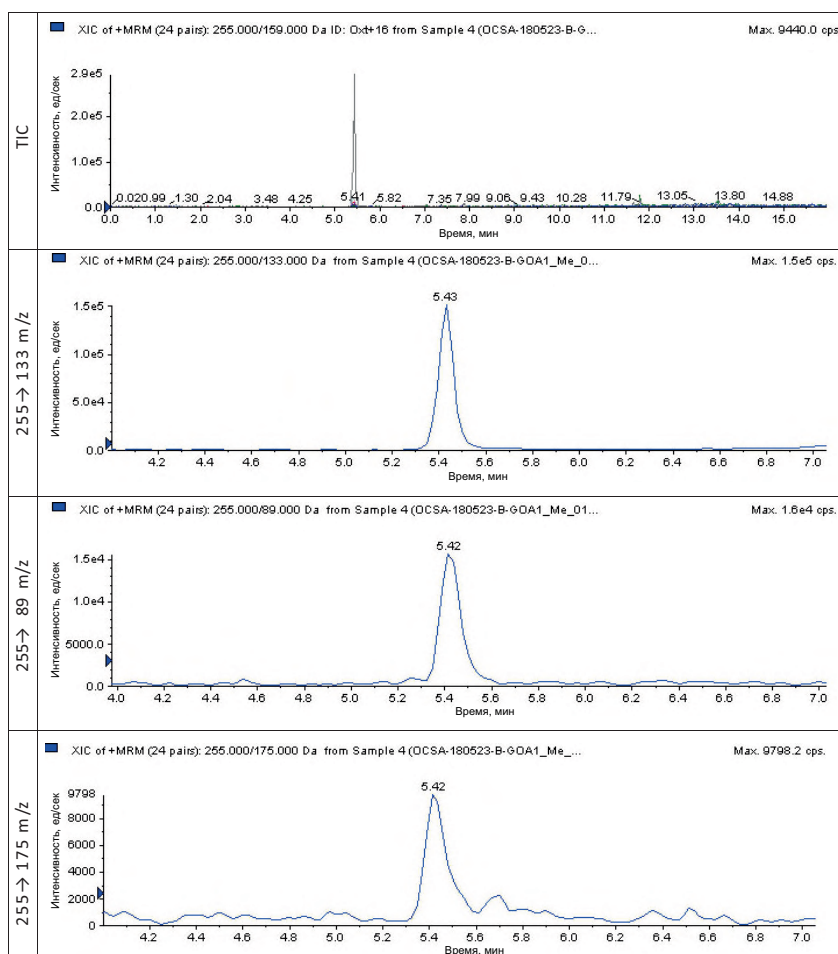


Рисунок 4 – Синтез N-оксида 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида (Б) с использованием 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида (А)

Рисунок 5 – ¹H-ЯМР-спектр N-оксида 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида в ДМСО-D₆Рисунок 6 – Пример MRM-хроматограммы N-оксида OXSA в образце крови с добавкой с концентрацией 500 нг/мл
Примечание: TIC – хроматограммы всех MRM-переходов (табл. 3).

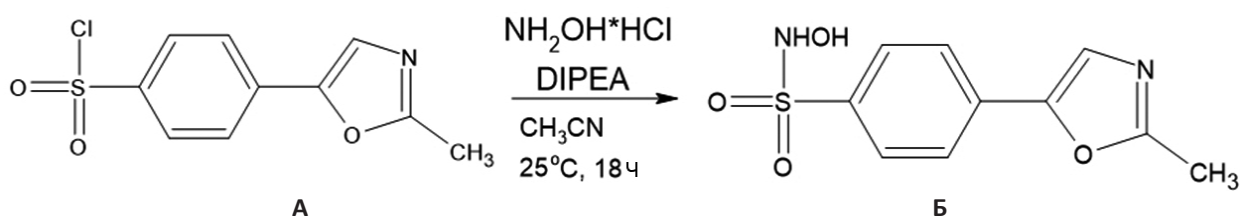


Рисунок 7 – Синтез N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида

Примечание: DIPEA – диизопропилэтиламин.

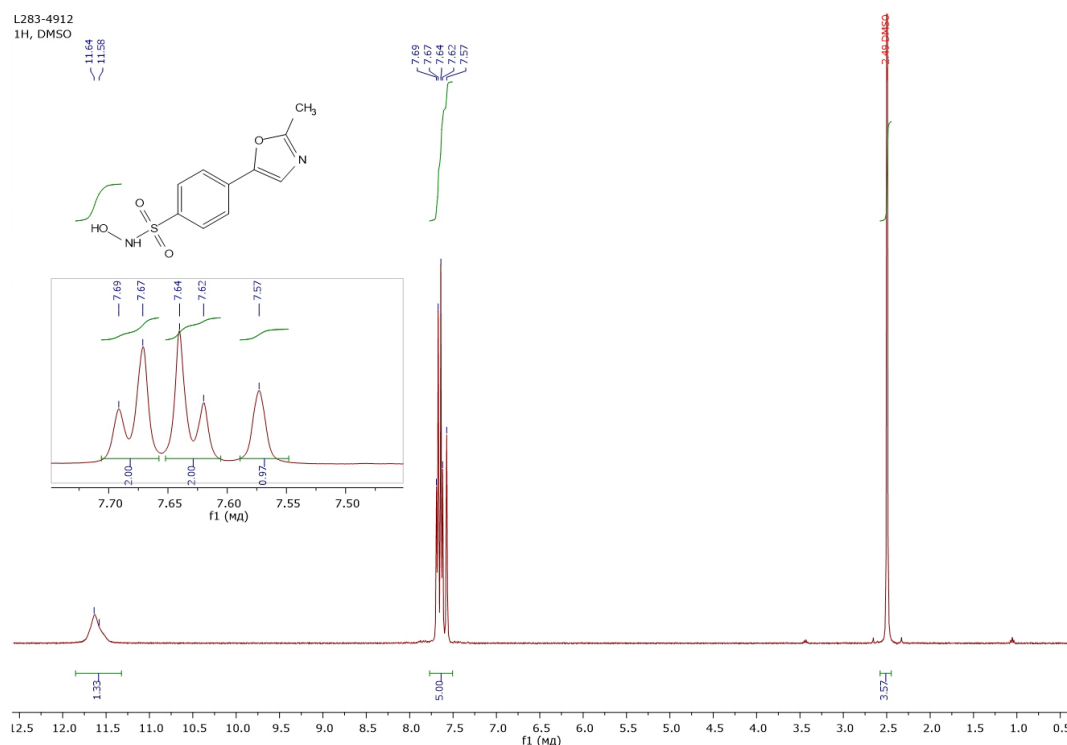
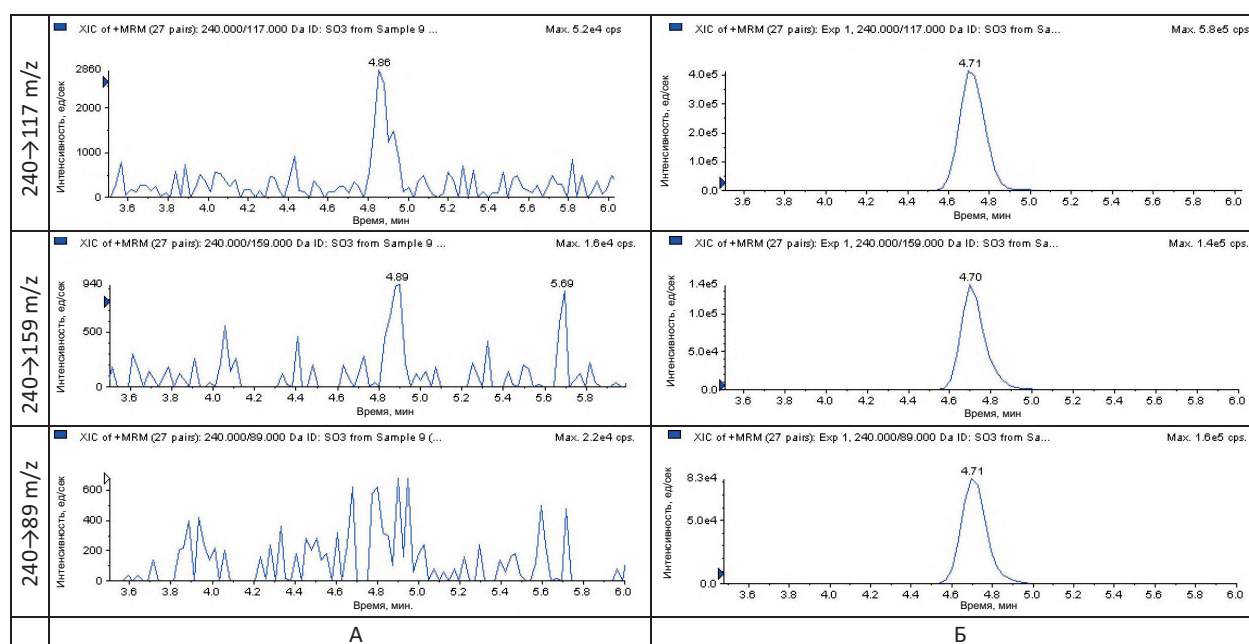
Рисунок 8 – ^1H -ЯМР-спектр N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида в $\text{DMSO}-\text{D}_6$ 

Рисунок 9 – Примеры хроматограмм пробы плазмы с добавкой метаболита после приготовления (А) и пробы плазмы с добавкой метаболита после 48 ч хранения при комнатной температуре (Б)

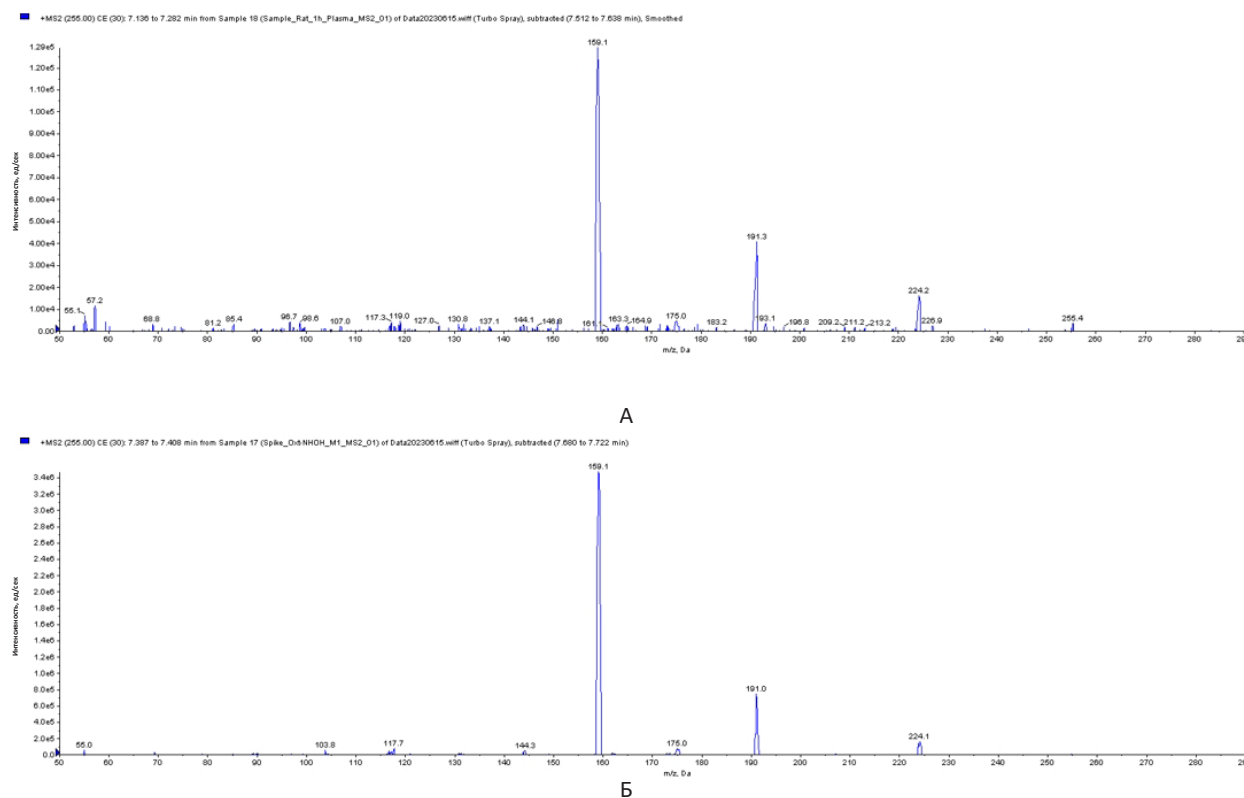


Рисунок 10 – Пример масс-спектров N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида в пробе плазмы крысы (точка 1 ч) (А) и в пробе с добавкой аналита с концентрацией 500 нг/мл (Б)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе исследования был получен масс-спектр молекулярного иона (режим MS2) 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида 239 m/z (Рис. 2). Для создания скринингового MRM-метода были выбраны ионы-продукты 89, 117 и 159 m/z, которые обладали наибольшей интенсивностью сигнала и полностью отражали фрагменты структуры OXSA, к которым могли быть присоединены функциональные группы. При прогнозировании возможных метаболитов с помощью программы «LightSight» 2.3 было установлено возможное присоединение гидроксильной группы к метильному радикалу фрагмента 2-метил-1,3-оксазола, N-оксидация оксазольного атома азота, а также метилирование, ацетилирование и сульфирование сульфонамидной группы. Прирост m/z в случае возникновения каждой модификации добавляли к m/z молекулярного иона и выбранным значениям m/z ионов-продуктов OXSA (табл. 3). Также создавали MRM-переходы с неизменёнными значениями 89, 117, 159 m/z.

После анализа образцов на хроматограммах плазмы, крови и мочи были обнаружены хроматографические пики на MRM-переходах 255→159, 255→117, 255→89 m/z с t_R =7,20 мин (табл. 4), которые отсутствовали на хроматограммах холостых образцов данных объектов. Данные

сигналы с $\Delta m/z=16$ свидетельствовали о добавлении атома кислорода к молекуле и возможному гидроксированию или образованию N-оксида. Хроматографических пиков на MRM-переходах других модификаций идентифицировано не было (Рис. 3).

Увеличения m/z ионов-продуктов 159, 117, 89 на 16 m/z не наблюдали. Наиболее вероятно, обнаруженный метаболит может быть получен в результате N-окисления 1,3-оксазольного атома азота, а прироста m/z нет из-за разрушения слабой связи в результате CAD-фрагментации [19]. Также возможен процесс гидроксирования сульфонамидной группы, так как на выбранных MRM-переходах она элиминирована.

Ввиду возможного гидроксирования молекулы OXSA были создан дополнительный MRM-метод, который учитывал возможную конъюгацию данного метаболита (табл. 5). Готовые образцы были повторно проанализированы. Однако хроматографических пиков метаболитов, по сравнению с холостыми образцами на полученных хроматограммах, обнаружено не было.

В ходе исследования был осуществлен синтез возможных метаболитов OXSA. Первым был получен N-оксид OXSA (Рис. 4), так как примеров N-гидроксирования сульфонамидной группы лекарственных средств в результате биотрансформации ранее не было опубликовано.

Субстанцию 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида (0,20 г, 0,84 ммоль, 1 экв), полученного по методу [1], суспендировали в 5 мл ледяной уксусной кислоты. К смеси добавляли 50% водный раствор перекиси водорода (0,170 г, 2,25 ммоль, 3 экв) и перемешивали 3 ч при температуре 50°C. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, выпавший осадок фильтровали и промывали 1 мл ледяной уксусной кислоты. В ходе эксперимента получено 0,1 г (50 %) N-оксида OXSA, выделенного в виде белого твердого вещества. Температура плавления данной субстанции составила 227–228°C. Результаты подтверждения структуры (Рис. 5):

^1H -ЯМР-спектроскопия (400 МГц, DMCO-D_6) δ , м.д.: δ 7,87 (кв., $J=8,0$ Гц, 4H, Ar), 7,70 (с, 1H, Het), 7,42 (с, 2H, NH_2), 2,52 (с, 3H, CH_3).

^{13}C -ЯМР-спектроскопия (100 МГц, DMCO-D_6) δ , м.д.: 168,31, 143,82, 133,51, 128,56, 128,19, 127,91, 123,42, 10,63.

Масс-спектрометрия: величина m/z молекулярного иона $[\text{M}+\text{H}]^+$: 255,0431 m/z ; $\Delta m/z=-1,18$ ppm (вычислено для теоретического значения $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}^+$: 255,0434 m/z).

Для проверки соответствия полученного N-оксида 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида структуре метаболита OXSA были приготовлены модельные смеси в плазме, крови и моче в концентрации 500 нг/мл, затем проанализированы. Время удерживания, а также основные MRM-переходы полученного вещества, отличались от данных характеристик обнаруженного в биологических жидкостях соединения (табл. 4, Рис. 6). Его t_R составлял 5,43 мин, что на 1,8 мин меньше метаболита OXSA. Величина m/z ионов-продуктов N-оксида OXSA 175 и 133 m/z , содержащих оксазольный атом азота, выше на 16 Да величины ионов-продуктов препарата 159 и 117 m/z . Таким образом, изучаемый метаболит не являлся N-оксидом.

Далее был синтезирован N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамид с помощью реакции нуклеофильного замещения с участием гидроксилamina и 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонилхлорида (Рис. 7).

Исходный 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонилхлорид (Рис. 7) был получен по известной методике [1]. К охлажденному водному раствору гидроксилamina гидрохлорида (0,2 г в пересчёте на чистое вещество, 2,9 ммоль, 1,5 экв.) прибавили диизопропилэтиламин (DIPEA) (0,75 г, 5,82 ммоль, 3 экв.). Затем в смесь при охлаждении медленно вносили раствор 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонилхлорида (0,5 г, 1,64 ммоль, 1 экв.) в 2 мл ацетонитрила и перемешивали в течение 18 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавили охлажденной водой очищенной.

Выпавший осадок фильтровали, промывали водой очищенной. Было получено 0,29 г N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида в виде белого осадка с выходом 60%. Температура разложения данной субстанции составила 300°C. Результаты подтверждения структуры:

^1H -ЯМР-спектроскопия (400 МГц, DMCO-D_6) δ , м.д.: δ 11,61 (д, $J=23,5$ Гц, 2H, OH, NH), 7,68 (д, $J=8,1$ Гц, 2H, Ar), 7,63 (д, $J=8,2$ Гц, 2H, Ar), 7,57 (с, 1H, Het), 2,49 (с, 3H, CH_3) (Рис. 8).

^{13}C -ЯМР-спектроскопия (101 МГц, DMCO-D_6) δ , м.д.: 161,95, 150,74, 148,39, 128,18, 126,97, 123,80, 122,91, 14,31.

Масс-спектрометрия: величина m/z молекулярного иона $[\text{M}+\text{H}]^+$: 255,0433 m/z ; $\Delta m/z=0,39$ ppm (вычислено для теоретического значения $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}^+$: 255,0434 m/z).

Далее были приготовлены модельные смеси в плазме, крови и моче с добавлением N-гидроксипроизводного OXSA с концентрацией 500 нг/мл. Анализ данных образцов показал, что времена удерживания и основные MRM-переходы синтезированного и обнаруженного вещества совпадали (табл. 4, Рис. 3В). При повторном анализе отобранных ранее проб биологических жидкостей животных для подтверждающего испытания хроматографические пики метаболита не были обнаружены, что свидетельствовало о его разложении. При модификации MRM-метода в модельных смесях N-гидроксиметаболита OXSA с концентрацией 10000 нг/мл после 48 ч хранения при комнатной температуре были обнаружены хроматографические пики на MRM-переходах 240→159, 240→117, 240→89 m/z с увеличенным m/z молекулярного иона на 1 Да и временем удерживания 4,7 мин (Рис. 9). Данные сигналы после последующей оптимизации параметров масс-спектрометрического детектора также идентифицированы в старых пробах животных. Это позволяет предположить, что полученное соединение разлагается с образованием сульфоновой кислоты.

Для подтверждения структуры метаболита OXSA и проверки наличия в свежих пробах второго возможного метаболита – 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфоновой кислоты препарат был введён животным повторно спустя 1 месяц в описанных выше дозировках. Образцы отбирали через такие же промежутки времени. При этом дополнительно к времени удерживания метаболита оценивали соотношения площадей хроматографических пиков MRM-переходов 255→117 к 255→159 m/z и 255→89 к 255→159 m/z . Для сравнения с синтезированным стандартным образцом при этом не использовали поздние временные точки 24 ч для плазмы и крови, а также временной диапазон 8–24 ч для мочи ввиду низких концентраций метаболита. На полученных в результате анализа свежееотобранных

образцов хроматограммах пики на MRM-переходах 240→159, 240→117, 240→89 m/z в районе времени удерживания 4,7 мин не были обнаружены. Следовательно, либо содержание OXSA-сульфоновой кислоты в пробах было ниже предела обнаружения метода, либо данное соединение не образуется в организме в процессе метаболизма. Поэтому 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфоновая кислота не синтезировалась, и её структура не подтверждалась при сравнении со стандартным образцом.

Результаты сравнения времени удерживания, соотношения площадей хроматографических пиков на MRM-переходах N-гидроксиметаболита OXSA представлены в таблице 6. Отношения средних значений t_R между испытуемыми образцами и модельными смесями метаболита для крови, плазмы, мочи укладывались в допустимый диапазон 99,0–101,0%, а соотношения площадей пиков – 80,0–120,0%.

Дополнительно оценивали процент совпадения масс-спектров молекулярного иона 255 m/z, полученных в режиме MS2. Сравнение полученных данных проводили с помощью ПО «Analyst 1.6.2» в точке 1 ч для крови и плазмы и в периоде 0–4 ч для мочи. Масс-спектры в биологических образцах совпадали с масс-спектрами в стандартных модельных смесях, как минимум на 89%, что подтверждало структуру метаболита. Примеры MS2-масс-спектров аналита в обработанных образцах плазмы представлены на рисунке 10.

Таким образом, идентифицированный метаболит является N-гидроксипроизводным OXSA по сульфонамидной группе. Ранее аналогичных примеров биотрансформации лекарственных препаратов, содержащих данную функциональную группу, в научных публикациях нами не обнаружено [25–29]. Это может быть связано с химическим разложением этих соединений в биологических жидкостях в процессе хранения до сульфокислот. При проведении фармакокинетических исследований для точного количественного определения метаболита OXSA может потребоваться добавление стабилизаторов к пробам сразу после отбора для предотвращения его деградации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что изучаемый препарат метаболизируется с образованием основного метаболита N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида. Данное соединение идентифицировано в плазме, крови и моче лабораторных животных. Структура метаболита подтверждена путем сравнения времени удерживания, соотношения площадей хроматографических пиков на основных MRM-переходах, а также масс-спектров с его синтезированным стандартным образцом. В дальнейшем будет проведено полное фармакокинетическое исследование препарата с применением синтезированной субстанции идентифицированного вещества, а также изучена его фармакологическая активность.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование биотрансформации (биоаналитическая часть и эксперимент на животных) выполнена за счёт средств государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка лекарственного препарата для лечения остроугольной глаукомы» (№ 1022051100011-8-3.1.5;3.2.17).

Синтез лекарственного вещества и его метаболитов выполнен за счет гранта Министерства просвещения Российской Федерации «Разработка инновационного лекарственного средства для лечения открытоугольной глаукомы путем селективного ингибирования карбоангидразы II» № 073-00077-21-02 (реестровая запись № 730000Ф.99.1.БВ10АА00006).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.Л. Хохлов – формулировка ключевой цели и задач; И.И. Яичков – разработка концепции, дизайна исследования биотрансформации, биоаналитического метода, анализ образцов крови, плазмы и мочи, интерпретация результатов исследования, написание и оформление текста статьи; А.А. Шетнев – разработка технологии синтеза лекарственного средства и его метаболитов, написание статьи (раздел, посвящённый синтезу), анализ и интерпретация полученных данных; С.А. Ивановский – фармацевтический анализ и описание структуры лекарственного средства и его метаболитов; М.К. Корсаков – формулировка ключевой цели и задач, разработка технологии синтеза лекарственного средства и его метаболитов, анализ и интерпретация полученных данных; О.А. Гасилина – синтез лекарственного средства и его метаболитов; Н.Н. Вольхин – забор образцов крови, плазмы и мочи; С.С. Петухов – анализ крови, забор образцов плазмы и мочи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ефимова Ю.А., Шетнев А.А., Гасилина О.А., Корсаков М.К. Эффективный путь синтеза 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида – перспективного противоглаукомного агента нового поколения // Бутлеровские сообщения. – 2022. – Т. 72, № 12. – С. 15–20. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/22-72-12-15
2. Ивановский С.А., Веселова В.Н., Шетнев А.А., Корсаков М.К. Разработка и валидация методики количественного определения 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)бензолсульфонамида – лекарственного кандидата для лечения глаукомы // Бутлеровские сообщения. – 2022. – Т. 72, № 12. – С. 139–146. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/22-72-12-139
3. Ferraroni M., Luccarini L., Masini E., Korsakov M., Scozzafava A., Supuran C.T., Krasavin M. 1,3-Oxazole-based selective picomolar inhibitors of cytosolic human carbonic anhydrase II alleviate ocular hypertension in rabbits: Potency is supported by X-ray crystallography of two leads // Bioorg Med Chem. – 2017. – Vol. 25, No. 17. – P. 4560–4565. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.06.054
4. Krasavin M., Korsakov M., Dorogov M., Tuccinardi T., Dedeoglu N., Supuran C.T. Probing the 'bipolar' nature of the carbonic anhydrase active site: aromatic sulfonamides containing 1,3-oxazol-5-yl moiety as picomolar inhibitors of cytosolic CA I and CA II isoforms // Eur J Med Chem. – 2015. – Vol. 101. – P. 334–347. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.06.022
5. Аладышева Ж.И., Беляев В.В., Береговых В.В., Бркич Г.Э., Грейбо С.В., Демина Н.Б., Джурко Ю.А., Ивановский С.А., Николенко Н.С., Комиссарова В.А., Корсаков М.К., Лаврентьева Л.И., Мешковский А.П., Мирошников А.Е., Онегин С.В., Парфенов А.А., Поздняков Н.О., Поройков В.В., Пятигорская Н.В., Пятигорский А.М., Раков А.А., Сидоров А.В., Спицкий О.Р., Трубников А.А., Хохлов А.А., Хохлов А.Л., Чикина И.В., Шабалина М.М., Шабров В.Н., Шитов Л.Н., Яичков И.И. Промышленная фармация. Путь создания продукта: монография / под ред. А.Л. Хохлова, Н.В. Пятигорской. – М.: РАН, 2019. – 394 с.
6. Alsibae A.M., Aljohar H.I., Attwa M.W., Abdelhameed A.S., Kadi A.A. Investigation of fenebrutinib metabolism and bioactivation using MS3 methodology in ion trap LC/MS // Molecules. – 2023. – Vol. 28. – Art. ID: 4225. DOI: 10.3390/molecules28104225
7. Geburek I., Schrenk D., These A. In vitro biotransformation of pyrrolizidine alkaloids in different species: part II—identification and quantitative assessment of the metabolite profile of six structurally different pyrrolizidine alkaloids // Arch Toxicol. – 2020. – Vol. 94, No. 11. – P. 3759–3774. DOI: 10.1007/s00204-020-02853-9
8. Trawinski J., Wronski M., Gawlik M., Skibinski R. Identification of the new metabolite of nebiivolol using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry and chemometrics // Molecules. – 2022. – Vol. 27, No. 3. – Art. ID: 763. DOI: 10.3390/molecules27030763
9. Peeters L., Vervliet P., Foubert K., Hermans N., Pieters L., Covaci A. A comparative study on the in vitro biotransformation of medicagenic acid using human liver microsomes and S9 fractions // Chemico-Biological Interactions. – 2020. – Vol. 328. – Art. ID: 109192. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109192
10. Boyce M., Favela K.A., Bonzo J.A., Chao A., Lizarraga L.E., Moody L.R., Owens E.O., Patlewicz G., Shah I., Sobus J.R., Thomas R.S., Williams A.J., Yau A., Wambaugh J.F. Identifying xenobiotic metabolites with in silico prediction tools and LCMS suspect screening analysis // Front Toxicol. – 2023. – Vol. 5. – Art. ID: 1051483. DOI: 10.3389/ftox.2023.1051483
11. Chen W.H., Chiu C.H., Farn S.S., Cheng K.H., Huang Y.R., Lee S.Y., Fang Y.C., Lin Y.H., Chang K.W. Identification of the hepatic metabolites of flumazenil and their kinetic application in neuroimaging // Pharmaceuticals. – 2023. – Vol. 16. – Art. ID: 764. DOI: 10.3390/ph16050764
12. Walczak M., Suraj-Prażmowska J., Kuś K., Kij A., Groszek G. A preliminary metabolites identification of a novel compound with β -adrenolytic activity // Pharmacol Rep. – 2021. – Vol. 73, No. 5. – P. 1373–1389. DOI: 10.1007/s43440-021-00273-9
13. Al-Shakliah N.S., Attwa M.W., Alrabiah H., Kadi A.A. Identification and Characterization of In vitro, In vivo and Reactive Metabolites of Tandutinib using Liquid Chromatography Ion Trap Mass Spectrometry // Analytical Methods. – 2021. – Vol. 13, No. 3. – P. 399–410. DOI: 10.1039/d0ay02106g
14. Belinskaia D.A., Savelieva E.I., Karakashev G.V., Orlova O.I., Leninskii M.A., Khlebnikova N.S., Shestakova N.N., Kiskina A.R. Investigation of bemethyl biotransformation pathways by combination of LC-MS/HRMS and in silico methods // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22. – Art. ID: 9021. DOI: 10.3390/ijms22169021
15. Levina I.S., Nazarov A.K., Nazarov G.V., Kulikova L.E., Kuznetsov Y.V., Dmitrenok A.S., Minin D.V., Aksenov A.V., Zavarzin I.V. In vivo study on biotransformation of pentacyclic analogs of progesterone: Identification of their metabolites by HPLC-MS method // J Steroid Biochem Mol Biol. – 2019. – Vol. 194. – Art. ID: 105436. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105436
16. Sun Z., Yang J., Liu L., Xu Y., Zhou L., Jia Q., Shi Y., Du X., Kang J., Zuo L. Pharmacokinetics and metabolite profiling of trepibutone in rats using ultra-high performance liquid chromatography combined with hybrid quadrupole-orbitrap and triple quadrupole mass spectrometers // Front Pharmacol. – 2019. – Vol. 10. – Art. ID: 1266. DOI: 10.3389/fphar.2019.01266
17. Zhu C., Wan M., Cheng H., Wang H., Zhu M., Wu C. Rapid detection and structural characterization of verapamil metabolites in rats by UPLC-MSE and UNIFI platform // Biomed Chromatogr. – 2020. – Vol. 34. – Art. ID: e4702. DOI: 10.1002/bmc.4702
18. Lee K., Lee J.Y., Lee K., Jung C.-R., Kim M.J., Kim J.A., Yoo D.G., Shin E.J., Oh S.J. Metabolite profiling and characterization of LW6, a novel HIF-1 α inhibitor, as an antitumor drug candidate in mice // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – Art. ID: 1951. DOI: 10.3390/molecules26071951
19. Reddy G.N., Laltanpuui C., Sonti R. Review on in vivo profiling of drug metabolites with LC-MS/MS in the past decade // Bioanalysis. – 2021. – Vol. 13, No. 22. – P. 1697–1722. DOI: 10.4155/bio-2021-0144
20. Alseekh S., Aharoni A., Brotman Y., Contrepois K., D'Auria J., Ewald J., C Ewald J., Fraser P.D., Giavalisco P., Hall R.D., Heinemann M., Link H., Luo J., Neumann S., Nielsen J., Perez de Souza L., Saito K., Sauer U., Schroeder F.C., Schuster S., Siuzdak G., Skirycz A., Sumner L.W., Snyder M.P., Tang H., Tohge T., Wang Y,

- Wen W., Wu S., Xu G., Zamboni N., Fernie A.R. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices // *Nature Methods*. – 2021. – Vol. 18, No. 7. – P. 747–756. DOI: 10.1038/s41592-021-01197-1
21. Хохлов А.Л., Рыска М., Кукес В.Г., Писачкова М., Печена М., Яворский А.Н., Шитов Л.Н., Джурко Ю.А., Ромодановский Д.П., Шитова А.М., Корсаков М.К., Лилеева Е.Г., Хохлов А.А., Поздняков Н.О., Мирошников А.Е., Воронина Е.А., Рыбачкова Ю.В., Яичков И.И. Современные подходы к проведению биоаналитических исследований при создании лекарственных препаратов: монография / под ред. А.Л. Хохлова. – М.: РАН, 2018. – 243 с.
22. Lo Faro A.F., Tini A., Gottardi M., Pirani F., Sirignano A., Giorgetti R., Busard F.P. Development and validation of a fast ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determining carbonic anhydrase inhibitors and their metabolites in urine and hair // *Drug Test Anal.* – 2021. – Vol. 13, No. 8. – P. 1552–1560. DOI: 10.1002/dta.3055
23. Dhandar A.G., Chaudhari S.R., Ganorkar S.B., Patil A.S., Surana S.J. Mini-Review on bioanalytical estimation of brinzolamide // *Curr Pharmaceut Analysis*. – 2022. – Vol. 8, No. 3. – P. 265–272. DOI: 10.2174/1573412917666210812103414
24. Mandour A., Nabil N., Zaaza H.E., Abdelkawy M. Review on analytical studies of some pharmaceutical compounds containing heterocyclic rings: brinzolamide, timolol maleate, flumethasone pivalate, and clioquinol // *Future J Pharmaceut Sci.* – 2020. – Vol.6. – Art. ID: 52. DOI: 10.1186/s43094-020-00068-4
25. Begou O., Drabert K., Theodoridis G., Tsikas D. GC-NICI-MS analysis of acetazolamide and other sulfonamide (R-SO₂-NH₂) drugs as pentafluorobenzyl derivatives [R-SO₂-N(PFB)₂] and quantification of pharmacological acetazolamide in human urine // *J Pharm Anal.* – 2020. – Vol. 10, No. 1. – P. 49–59. DOI: 10.1016/j.jpha.2019.11.006
26. Карнакова П.К., Комаров Т.Н., Арчакова О.А., Щелгачева Д.С., Алешина А.В., Багаева Н.С., Карпова П.А., Шохин И.Е. Совместное определение кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2021. – Т. 10, № 4. – С. 177–189. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-177-189
27. Haque A., Iqbal M., Alamoudi M.K., Alam P. A Selective and accurate LC-MS/MS method for simultaneous quantification of valsartan and hydrochlorothiazide in human plasma // *Separations*. – 2023. – Vol. 10. – Art. ID: 119. DOI: 10.3390/separations10020119
28. Ma Y., Modrzynski J.J., Yang Y., Aamand J., Zheng Y. Redox-dependent biotransformation of sulfonamide antibiotics exceeds sorption and mineralization: Evidence from incubation of sediments from a reclaimed water-affected river // *Water Res.* – 2021. – Vol. 205. – Art. ID: 117616. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117616
29. Vree T.B., Hekster Y.A., Tjhuis M.W. Metabolism of sulfonamides // *Antibiotics and Chemotherapy. Pharmacokinetics of Sulfonamides Revisited*. – 1985. – Vol. 34. – P. 5–65. DOI: 10.1159/000410271

АВТОРЫ

Хохлов Александр Леонидович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, ректор ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-0032-0341. E-mail: al460935@yandex.ru

Яичков Илья Игоревич – кандидат фармацевтических наук, научный сотрудник отдела аналитической разработки и контроля качества Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО ЯГПУ им. К.Д. Ушинского; научный сотрудник Института фармации ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-0066-7388. E-mail: i.yaichkov@yspu.org

Шетнев Антон Андреевич – кандидат химических наук, руководитель отдела фармацевтической разработки Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО ЯГПУ им. К.Д. Ушинского. ORCID ID: 0000-0002-4389-461X. E-mail: a.shetnev@list.ru

Сергей Александрович Ивановский – кандидат химических наук, руководитель отдела аналитической разработки и контроля качества Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО ЯГПУ им. К.Д. Ушинского. ORCID ID: 0000-0002-1421-9236. E-mail: main_engine@mail.ru

Корсаков Михаил Константинович – доктор химических наук, профессор кафедры химии, теории и методики преподавания химии, директор Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО ЯГПУ им. К.Д. Ушинского. ORCID ID: 0000-0003-0913-2571. E-mail: m.korsakov@yspu.org

Ольга Андреевна Гасилина – инженер отдела фармацевтической разработки Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО ЯГПУ им. К.Д. Ушинского. К.Д. ORCID ID: 0000-0001-9701-9207. E-mail: olgagasilina23@yandex.ru

Вольхин Никита Николаевич – младший научный сотрудник отдела фармакологических исследований Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО ЯГПУ им. К.Д. Ушинского. ORCID ID: 0000-0002-4275-9037. E-mail: nnvolkhin@ysmu.ru

Петухов Сергей Станиславович – инженер отдела фармакологических исследований Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО ЯГПУ им. К.Д. Ушинского; младший научный сотрудник Института фармации ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0009-0007-8435-7689. E-mail: sspp465@mail.ru