



УДК 547.91

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ N,N-ДИМЕТИЛ-О-(β-D-ГЛЮКОПИРАНУРОНОЗИЛ)-5-ОКСИТРИПТАМИНА  
КАК МЕТАБОЛИТА БУФОТЕНИНА В ОРГАНИЗМЕ КРОЛИКОВ**

*Вигдорчик М. М., Турчин К. Ф., Гуськова Т. А.*

*Всесоюзный научно-исследовательский химико-фармацевтический институт им. С. Орджоникидзе, Москва*

*Якубович Л. М., Красавина Л. С., Лукин О. В.,  
Луценко Н. Г., Суворов Н. Н.*

*Московский химико-технологический институт им. Д. И. Менделеева*

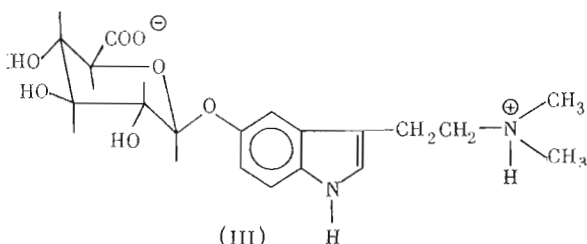
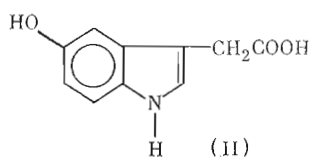
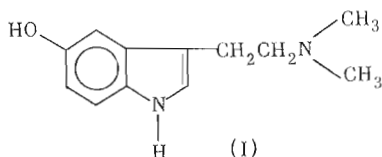
Путем сочетания колоночной хроматографии на целлюлозе с препаративным электрофорезом на бумаге в кислом буфере из мочи кролика впервые выделен глюкуронид индолилалкиламина, являющийся метаболитом буфотенина. Сопоставлением данных хроматографии, электрофореза и спектроскопии ПМР синтетического образца и выделенного из мочи метаболита однозначно доказано, что последний является N, N-диметил-О-(β-D-глюкопирануронозил)-5-окситриптамином.

Как показали исследования последнего времени [1–3], N,N-диметил-5-окситриптамиин (I) (буфотенин) может образовываться в организме животных и человека путем N-метилирования серотонина при участии индолилэтиламин-N-метилтрансферазы, причем такое превращение серотонина может преобладать в случае торможения основного пути метаболизма серотонина — окислительного дезаминирования.

Так как буфотенин является сильным психотомиметиком, не исключено, что он может играть определенную роль в патогенезе некоторых психических расстройств. Поэтому изучение его метаболизма важно как с биохимической, так и с психофармакологической точек зрения. Между тем метаболизм буфотенина изучен недостаточно. Известно лишь, что, в то время как серотонин при метаболизме подвергается главным образом окислительному дезаминированию, буфотенин, по данным работы [4], относительно устойчив к дезаминированию и выделяется с мочой кроликов в течение суток в неизменном виде в количестве до 20% введенной дозы и только 7% его (по содержанию в моче) превращается в 5-оксиндолилуксусную кислоту (II). Возможно, наличие двух метильных групп при основном атоме азота в молекуле буфотенина затрудняет его дезаминирование моноаминоксидазой и тем самым обуславливает преобладание другого пути дезактивации буфотенина, а именно «О-конъюгации» с глюкуроновой кислотой.

Ранее среди продуктов метаболизма буфотенина было обнаружено соединение (II) и высказано предположение, что одним из неидентифицированных метаболитов является О-глюкуронид буфотенина [4], однако каких-либо свидетельств в пользу такого предположения получено не было. Это обстоятельство побудило нас осуществить синтез N,N-диметил-О-(β-D-глюкопирануронозил)-5-окситриптамиина (III). Путем взаимодействия метилового эфира 1-бром-1-дезоксид-2,3,4-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранурановой кислоты с Li-солью буфотенина с последующим удалением защитных группировок с образовавшегося О-гликозида был получен глюкуронид (III), структура которого была подтверждена данными ПМР, электрофореза и ИК-спектроскопии [5].

В настоящей работе синтетический образец глюкуронида буфотенина (III) был использован в качестве свидетеля для обнаружения этого вещества в моче кроликов и для однозначной идентификации метаболита.



С этой целью было проведено определение продуктов обмена буфотенина в суточном объеме мочи кроликов, в ушную вену которых вводили 5% водный раствор адипината буфотенина или 0,5% раствор той же соли, приготовленной на физиологическом растворе. Доза буфотенина (в расчете на основание) составляла 0,5–3 мг/кг массы кролика при использовании водного раствора и 13,8 мг/кг массы кролика при использовании в качестве растворителя физиологического раствора. Следует отметить, что разбавленные раствора адипината буфотенина, медленное (в течение 5–10 мин) его введение и использование в качестве растворителя физиологического раствора позволяет вводить кроликам большие дозы буфотенина. Контрольным животным в ушную вену вводили такой же объем воды или физиологического раствора и проводили соответствующие определения в их моче. Образцы собранной мочи без предварительной обработки или после лиофильного высушивания и растворения в воде сухого остатка изучали с помощью ТСХ и БХ.

Во всех случаях хроматографическая подвижность определяемых продуктов обмена буфотенина совпадала с подвижностью синтетических соединений (II) и (III) (значения  $R_f$ , см. в таблице). На хроматограммах тех же образцов мочи четко обнаруживался и неизменный амин (I). Согласно данным электрофореза на бумаге в системе уксусная кислота — муравьиная кислота — вода, 20 : 7 : 173 (рН 2), метаболиты буфотенина обладают такой же подвижностью, как и синтетические соединения (II) и (III) ( $E_r$  относительно амина (I) соответственно 0,37 и 0,80).

Результаты предпринятых нами попыток препаративного выделения метаболита буфотенина, совпадающего по подвижности с синтетическим образцом (III), с помощью хроматографии на колонках, ТСХ и БХ оказались неудовлетворительными. Полученные препараты неизменно содержали мочевину, следы неидентифицированных веществ и кислоты (II) и были непригодны для строгого доказательства структуры метаболита.

Сравнительно чистые образцы метаболита буфотенина, соответствующие, по хроматографическим данным, синтетическому соединению (III),

**Хроматографическая подвижность буфотенина и его метаболитов**

Система растворителей *	Способ хроматографии	$R_f$ веществ		
		(I)	(II)	(III)
А	ТСХ	0,50	0,00	0,07
Б	»	0,31	0,89	0,10
В	БХ	0,50	0,48	0,71
Б	»	0,50	0,67	0,19
Г	»	0,35	0,53	0,65

\* Изопропанол — бензол — водный аммиак, 10 : 5 : 2 (А), бутанол — уксусная кислота — вода, 12 : 3 : 5 (Б), 10% КСl (В), 20% КСl (Г).

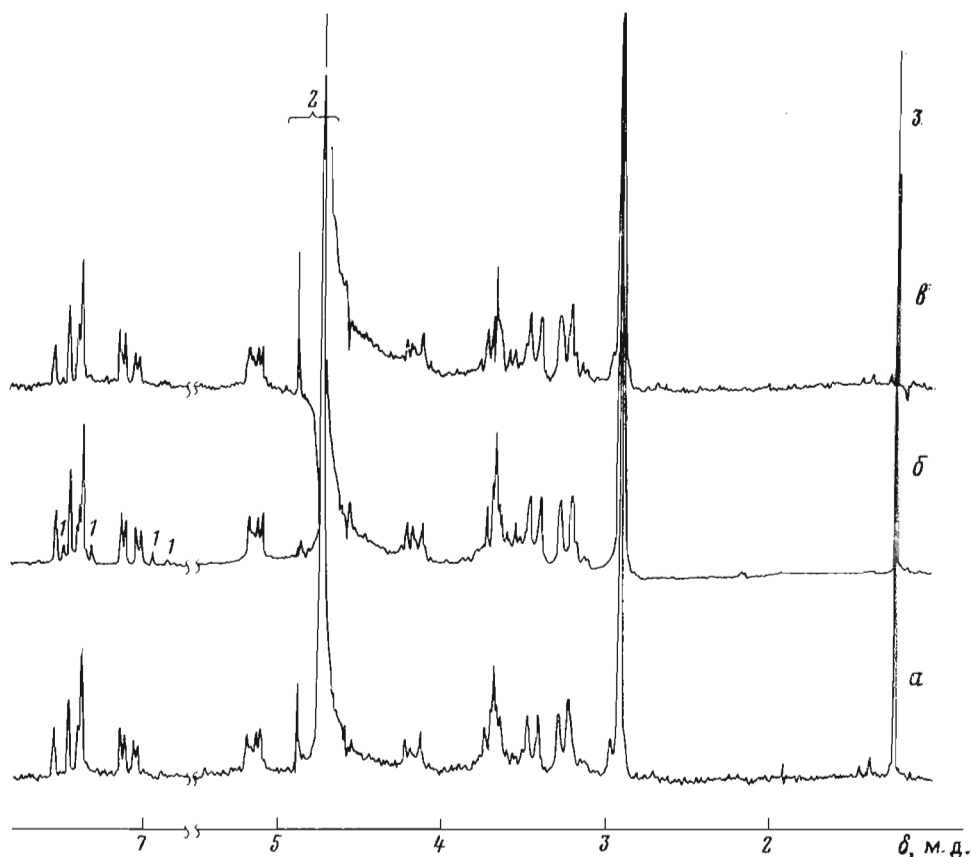


Рис. 1. Спектры ПМР продукта биотрансформации буфотенина в организме кролика (а), синтетического О-глюкуронида буфотенина (б) и смеси синтетического и биогенного продуктов в концентрации, близкой к эквимолярной (в); 1 — сигналы неидентифицированной примеси; 2 — сигнал остаточных протонов растворителя, 3 — сигнал стандарта —  $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$  ( $\delta$ 1,23 м.д., ср. [6])

были получены лишь при сочетании колоночной хроматографии на целлюлозе с препаративным электрофорезом на бумаге в кислом буфере.

В силу большого различия  $pK_a$  кислоты (II), мочевины и глюкуронида (III) препаративный электрофорез на бумаге в кислом буфере (рН 2) позволяет вполне удовлетворительно отделить соединение (III) от небольших количеств кислоты (II) и мочевины, а также от неидентифицированных примесей, являющихся, судя по электрофоретической подвижности, кислотами.

Для препаративного выделения метаболита (III) суточную мочу кроликов высушивали на целлюлозе ЛТ при  $20^\circ\text{C}$  и хроматографировали на колонке ( $2 \times 12$  см) с целлюлозой последовательно в системах изопропанол — бензол — водный аммиак (10 : 5 : 1), ацетон — метанол (2 : 1) и в метаноле. Согласно данным ТСХ, указанные системы элюировали соответственно амин (I) и мочевины, кислоту (II) и, наконец, соединение (III) со следами кислоты (II) и неидентифицированными веществами. Фракции, полученные при элюировании метанолом, после упаривания до небольшого объема для окончательной очистки подвергались препаративному электрофорезу на бумаге в кислом буфере (рН 2) в течение 2 ч. Следует отметить, что увеличение продолжительности электрофореза сопровождается гидролизом О-глюкуронида, о чем свидетельствует появление на электрофореграммах пятна амина (I). Из соответствующей зоны электрофореграммы после ее предварительной промывки хлороформом и ацетоном для удаления содержащихся в бумаге примесей метаболит буфотенина был экстрагирован водой. По данным ТСХ и хроматографии на бумаге, полученные лиофильно высушенные препараты метаболита оказались хроматографи-

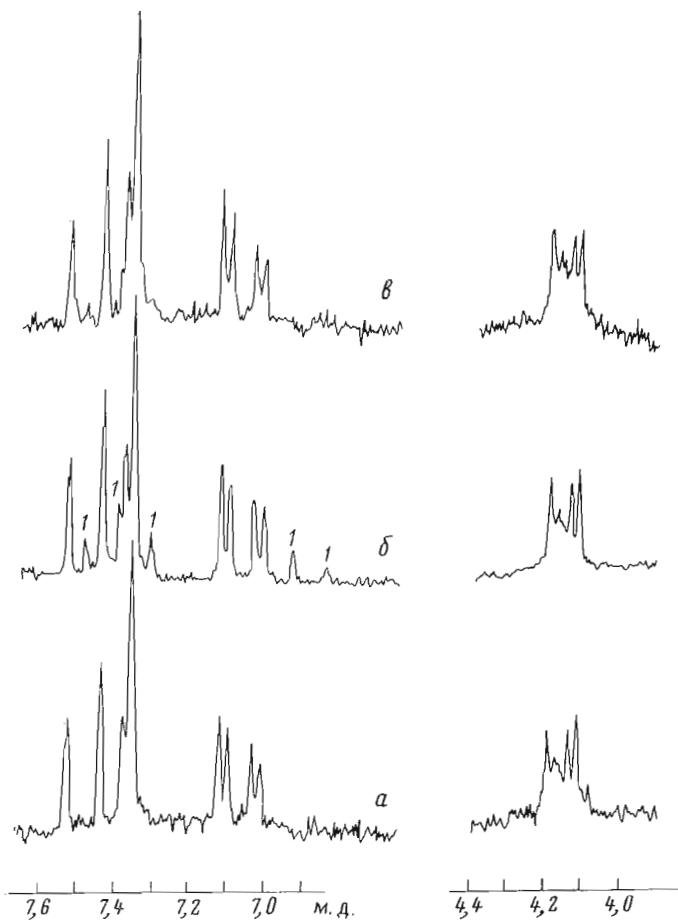


Рис. 2. Фрагменты спектров ПМР, приведенных на рис. 1. Сигналы протонов индольного ядра (слева) и протона при С-1' углеводного остатка (справа)

чески однородными и совпадали по подвижности с синтетическим образцом О-глюкуронида (III).

Строение продукта биотрансформации буфотенина было подтверждено методом спектроскопии ПМР. Ввиду зависимости параметров спектра глюкуронида (III) от примесей, способных изменить рН раствора (например, примеси уксусной или муравьиной кислот из буферного раствора, использованного при электрофорезе), для съемки спектров с целью доказательства идентичности синтетического и биогенного продуктов был взят 0,2 н. раствор DCl, в котором соединение (III) существует только в форме катона. В спектре ПМР синтетического О-глюкуронида (III) (рис. 1б и 2б) сигналы протонов индолилэтиламинного остатка наблюдаются при  $\delta$  7,35 (2-Н), 7,36 (д, 4-Н,  $J_{4,6}$  2,5 Гц), 7,08 (к, 6-Н,  $J_{6,7}$  8,8 Гц), 7,47 (7-Н), 3,22 (м,  $\text{CH}_2$ ), 3,45 (м,  $\text{CH}_2$ ) и 2,90 м.д. ( $\text{CH}_3$ ); протонам углеводного остатка отвечали сигналы при  $\delta$  5,15 (искаженный дублет, 1'-Н [5],  $J_{1',2'}$  7 Гц), 4,14 (искаженный дублет, 5'-Н,  $J_{4',5'}$  9 Гц) и 3,5–3,7 м.д. (сложный мультиплет, 2'-Н–4'-Н)\*. Сигналы тех же протонов наблюдаются и в спектре продукта биогенного происхождения (рис. 1а и 2а), причем положения аналогичных сигналов в спектрах синтетического и биогенного продуктов различаются не более чем на 0,006 м.д. С целью подтверждения идентичности биогенного и синтетического продуктов был снят спектр образца, представляющего собой смесь этих продуктов в concentra-

\* Вследствие различия в растворителях химические сдвиги протонов соединения (III), найденные в данной работе, заметно отличаются от приведенных нами ранее [5].

ции, близкой к эквимольярной (рис. 1в и 2в). Наличие в этом спектре единственного набора сигналов, отнесенных выше к соответствующим протонам соединения (III), доказывает идентичность метаболита буфотенина и синтетического О-глюкуронида.

Таким образом, однозначно доказано, что N,N-диметил-О-(β-D-глюкопирануросил)-5-окситриптамиин является природным метаболитом буфотенина.

Следует отметить, что даже визуальная оценка количественных соотношений соединений (II) и (III) на хроматограммах мочи кроликов позволяет заключить, что по крайней мере при большой нагрузке буфотенином в смеси его метаболитов преобладает О-глюкуронид (III). Это наблюдение свидетельствует в пользу предположения о преимущественно «конъюгационном» пути метаболизма буфотенина.

### Экспериментальная часть

В опытах по изучению метаболизма буфотенина использовали кроликов «шиншилла» (самки) весом 2,0–3,0 кг. В течение суток после введения препарата животные получали только воду. Сбор мочи проводили в стерильной обменной клетке. Собранную за сутки мочу лиофилизировали или хранили при –5°С. Препаративное выделение метаболита буфотенина (III) осуществлено из суточной мочи кролика (125 мл), которому в ушную вену был введен буфотенин в физиологическом растворе в дозе 13,8 мг/кг веса.

Для хроматографии использовали силуфол UV<sub>254</sub> и бумагу Filtrak № 53 (Англия). На этой же бумаге проводили электрофорез (прибор «ЭМИБ» напряженность поля 7–8 В/см). Хроматограммы и электрофореграммы проявляли реактивом Эрлиха при 100–120°С.

Спектры НМР сняты на спектрометре XL-100А (Varian, Швейцария) при рабочей частоте 100 МГц в импульсном режиме с 500-кратным накоплением сигнала и фурье-преобразованием. Для ослабления интенсивного сигнала остаточных протонов использовала методика WEFT, время задержки между 180- и 90-градусными импульсами 2,5–3 с.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Franzen F., Gross H. Nature, 1965, v. 206, № 4988, p. 1052.
2. Axelrod J. J. Pharmacol. and Exptl Ther., 1962, v. 138, № 1, p. 28–33.
3. Morgan M., Mandell A. Science, 1969, v. 165, № 3892, p. 492–493.
4. Gessner P. K., Khairallah P. A., McIsaac W. H., Page I. H. J. Pharmacol. and Exptl Ther., 1960, v. 130, № 2, p. 126–133.
5. Красавина Л. С., Вигдорчик М. М., Турчин К. Ф., Суворов Н. Н. Ж. орган. химии, 1979, т. 15, № 2, с. 431–435.
6. Эмели Дж., Финей Дж., Сатклиф Л. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса высокого разрешения. М.: Мир, 1965, т. 1, с. 250.

Поступила в редакцию  
18.VII.1983

### IDENTIFICATION OF N,N-DIMETHYL-O-(β-D-GLUCOPYRANURONOSYL)-5-HYDROXYTRYPTAMINE AS A BUFOTENINE METABOLITE IN RABBITS

VIGDORCHIK M. M., TURCHIN K. F., GUSKOVA T. A., YAKUBOVICH L. M., KRASAVINA L. S., LUKIN O. V., LUTSENKO N. G., SUVOROV N. N.

S. Ordzhonikidze All-Union Institute of Chemical and Pharmaceutical Research, Moscow; D. I. Mendeleev Chemical Technological Institute, Moscow

A bufoteniine metabolite has been isolated from the rabbit urine by the column chromatography on cellulose and preparative paper electrophoresis in acidic buffer. It has the structure of N,N-dimethyl-O-(β-D-glucopyranuronosyl)-5-hydroxytryptamine as proved by comparison of chromatographic, electrophoretic and NMR data with those for respective synthetic O-glycuronide.