

УДК 615.015.33; 615.013

©Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ВСАСЫВАНИЯ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ В СОСТАВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА “ФОСФОГЛИВ”

А.А. Воскресенская, Н.В. Медведева, В.Н. Прозоровский,
Н.Е. Москалева, О.М. Ипатова*

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН,
Погодинская ул., 10, 119121 Москва; тел.: (495) 708-38-07;
эл. почта: voskresenskaya_a@mail.ru.

Глицирризиновая кислота (ГК) – один из биологически активных компонентов отечественного препарата “Фосфоглив” – обладает крайне низкой биодоступностью. Для исследования особенностей всасывания глицирризиновой кислоты при пероральном введении “Фосфоглива” и натриевой соли ГК, был разработан чувствительный метод её количественного определения в крови с использованием высоко-эффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС). Разделение компонентов крови происходило в градиентном режиме на обращено-фазной колонке C18 ЭкоНова ProntoSIL. Детектирование ГК и внутреннего стандарта (глицирретовая кислота) проводили в режиме отрицательной ион-селективной регистрации (SIM) при m/z 821,3 и 469,3, соответственно. Калибровочная зависимость линейна в диапазоне концентраций от 50 до 5000 нг/мл крови (коэффициент корреляции 0,995). При этом предел обнаружения метода 25 нг/мл крови, а нижний предел количественного определения – 50 нг/мл крови.

Разработанный метод был применен для сравнения эффективности всасывания глицирризиновой кислоты в составе лекарственного препарата “Фосфоглив” и раствора натриевой соли ГК в экспериментах *in vivo* в первые два часа после их однократного перорального введения. Используемая доза составляла 8,5 мг/кг. Нами показано, что всасывание ГК происходит уже в первые минуты после её перорального введения, причем получено, что биодоступность глицирризиновой кислоты после введения препарата “Фосфоглив” выше, чем натриевой соли ГК. Наблюдаемое различие, по-видимому, объясняется включением глицирризиновой кислоты в состав фосфолипидных наночастиц.

Ключевые слова: биодоступность лекарств, “Фосфоглив”, мониторинг, глицирризиновая кислота, глицирретовая кислота, ВЭЖХ-МС.

ВВЕДЕНИЕ. Отечественный лекарственный препарат “Фосфоглив” для лечения заболеваний печени, разработанный в ГУ НИИ БМХ РАМН [1], содержит два биологически активных компонента – полиненасыщенный фосфатидилхолин растительного происхождения и натриевую соль глицирризиновой кислоты (ГК). Препарат представляет собой лиофилизированный порошок и может быть использован как для инъекционного, так и перорального применения. Оригинальная технология производства “Фосфоглива” позволяет без использования сурфактантов и стабилизаторов получать в виде готовой лекарственной формы лиофилизированный порошок, который при растворении в воде образует наноземulsion фосфолипидных частиц, средним диаметром 30-50 нм.

* - адресат для переписки

ОСОБЕННОСТИ ВСАСЫВАНИЯ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Фосфатидилхолин (лецитин) сои, входящий в состав препарата “Фосфоглив”, обладает способностью восстанавливать клетки печени, как при пероральном (при поступлении с пищей продукты деградации служат источником для эндогенного синтеза компонентов мембран всех клеток организма, нормализуют работу печени и т.д.) так и при его внутривенном введении, непосредственно участвуя в репарации мембран, процессах детоксикации, способствуя снижению уровня холестерина в крови и т.п. Второй компонент препарата – глицирризиновая кислота – тритерпеновый гликозид, образованный одной молекулой глицирретовой кислоты и двумя молекулами глюкуроновой кислоты. Установлено, что ГК обладает широким спектром биологического действия: в частности воздействует на целый ряд вирусов и микроорганизмов, таких как вирус СПИДа, герпес, гепатиты А, В, С, возбудитель туберкулёза и т. д., а также обладает противовоспалительным, противоаллергическим, гепатопротекторным, иммуномодулирующим и противоязвенным действием [1, 2]. Активным метаболитом ГК является глицирретовая кислота (ГА), которая по активности значительно превосходит ГК [2, 3]. Образование ГА происходит только под действием микрофлоры кишечника [4], доказательством чему является отсутствие ГА в плазме крыс с убитой микрофлорой [5,6]. Несмотря на то, что ГА по биологической активности превосходит ГК, именно последняя входит в состав лекарственных композиций.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим или флуориметрическим детектированием до сих пор остаётся наиболее распространенным методом при исследовании фармакокинетики лекарственных субстанций. Однако, в связи с тем, что биодоступность глицирризиновой кислоты при пероральном введении чрезвычайно низка, изучение её фармакокинетических параметров данным методом связано с большими трудностями: значительное количество биоматериала, большие колонки, длительное время анализа. В экспериментах на крысах при пероральном введении ГК, глицирризиновая кислота достоверно определяется в плазме при дозах 50-500 мг/кг. У добровольцев даже при дозе 1,6 г глицирризиновую кислоту в плазме обнаружить не удалось [7]. Только совместно с соединениями, способствующими увеличению всасывания, в экспериментах на лабораторных животных удалось наблюдать появление ГК в течение первого часа после её перорального введения при дозе 100 мг/кг [8].

В работе Lin et al., [9] в экспериментах *in vitro* была показана принципиальная возможность определения ГК в плазме крови при концентрации от 10 нг/мл с использованием жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (режим детектирования заданных масс; MRM в англоязычной литературе). Цель нашей работы – изучение фармакокинетики терапевтических доз ГК (8,5 мг/кг) и сравнение биодоступности глицирризиновой кислоты при введении натриевой соли ГК и препарата “Фосфоглив”. В соответствии с этой целью была поставлена задача разработать высокочувствительный метод определения глицирризиновой кислоты с использованием ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС)

МЕТОДИКА.

Материалы и реагенты. В работе использовали натриевую соль глицирризиновой кислоты (~75% чистоты) фирмы “Sigma” (США), глицирретовую кислоту, полученную в лаборатории нанолекарств ИБМХ РАМН [10], а также инъекционную форму препарата “Фосфоглив” (производство ИБМХ РАМН, Россия). Структурные формулы глицирризиновой и глицирретовой кислот приведены на рисунке 1. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (“Синтез АКО”, Россия). В экспериментах по определению ГК использовали растворители высокой степени чистоты: ацетонитрил – HPLC-grade, “Acros Organics” (США), метанол – HPLC-grade, “Fluka” (Великобритания), муравьиная кислота – analytical grade, “Merck” (Германия), а также вода, очищенная с использованием установки “Millipore milli-Q” (Millipore Corporation, США).

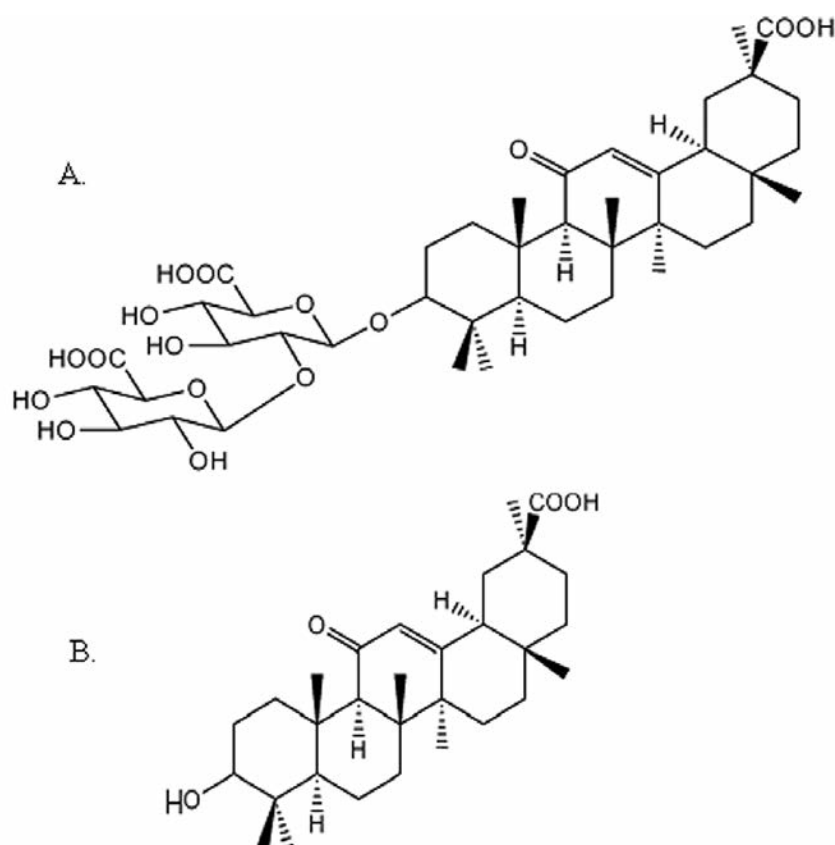


Рисунок 1.

Структурные формулы глицирризиновой (А) и глицирретовой (В) кислот.

Аппаратура и условия проведения анализов. Анализ содержания глицирризиновой и глицирретовой кислот проводили с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1100, соединённого с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Agilent G1956B ("Agilent Technologies", США) с использованием аналитической обращённо-фазной колонки ЭкоНова ProntoSIL C-18 (5 мкм, 75 мм \times 2 мм). Подвижная фаза – ацетонитрил : 0,1% раствор муравьиной кислоты. Условия хроматографирования следующие: 0-5 минут – градиент ацетонитрила с 5 до 60%, 5-12 минут – 60% ацетонитрила, 12-15 минут – градиент ацетонитрила с 60 до 90%, 15-18 минут – 90% ацетонитрила, 18-20 минут – возвращение к исходным условиям – с 90 до 5% ацетонитрила. Температура колонки (25°C) и скорость потока элюента (0,2 мл/мин) поддерживались постоянными. Объём образца, вносимого на колонку, 5 мкл.

В качестве источника ионов был использован электроспрей. Анализ проводили в режиме отрицательной ион-селективной регистрации по двум каналам с заданными значениями m/z . Глицирризиновая и глицирретовая кислоты регистрировались при m/z 821,3 и 469,3, соответственно. Параметры масс-спектрометрического детектора, при которых наблюдался максимальный отклик молекулярных ионов анализируемых веществ, следующие: расход осушающего газа 11 л/мин; температура осушающего газа 350°C; давление распыления 2,8 атм.; напряжение на капилляре 3000 В; фрагментор 90. Хроматограммы обрабатывали с использованием программного обеспечения ChemStation B.01.03.

Приготовление стандартных и калибровочных растворов. Маточный раствор глицирризиновой кислоты в воде был приготовлен в концентрации 1 мг/мл. Стандартные растворы с концентрацией вещества 50000, 10000, 5000,

ОСОБЕННОСТИ ВСАСЫВАНИЯ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ

1000 и 500 нг/мл были получены последовательным разведением исходного раствора водой. Калибровочные растворы с концентрацией глицирризиновой кислоты 5000, 1000, 500, 100, 50 нг/мл были приготовлены добавлением соответствующих стандартных растворов к гепаринизированной крови крыс.

Аналогично были приготовлены калибровочные растворы для определения глицирретовой кислоты в диапазоне концентраций от 10 до 1000 нг/мл.

Раствор глицирретовой кислоты (внутренний стандарт) в метаноле, был приготовлен в концентрации 10 мкг/мл (ВС).

Пробоподготовка образцов. К 45 мкл гепаринизированной крови добавляли 5 мкл раствора ВС. Для экстракции ГК и осаждения белков к образцам добавляли 450 мкл метанола, инкубировали в течение 5 минут при интенсивном перемешивании. Затем образцы центрифугировали в течение 10 минут при 13000 об/мин (MiniSpin plus, "Eppendorf", Германия). Для анализа с целью повышения чувствительности определения ГК супернатант вдвое разбавляли водой [11]. Коэффициент извлечения глицирризиновой кислоты из крови составляет 82,3%.

Эксперименты на животных. Эксперименты проводили на крысах-самцах породы Wistar массой (300 ± 20 г). Животных содержали при нормальном световом режиме и на стандартной диете. За 16 часов до эксперимента у животных убирали еду, оставляя воду. Для эксперимента животные были поделены на 2 группы по 5 в каждой.

ГК и "Фосфоглив" вводили перорально в виде водных растворов. Водный раствор натриевой соли глицирризиновой кислоты готовили в концентрации 5 мг/мл. Раствор "Фосфоглива" готовили растворением в воде содержимого флакона инъекционной формы препарата, содержащего 200 мг ГК, доводили водой до 10 мл и разбавляли до концентрации 5 мг/мл. Концентрации приготовленных растворов контролировали методом ВЭЖХ.

Растворы ГК и "Фосфоглива" вводили животным перорально по 0,5 мл, т.е. вводимая доза по глицирризиновой кислоте для обоих препаратов составляла 8,5 мг/кг. Через определённые промежутки времени после перорального введения исследуемого раствора (2, 12, 22, 32, 42, 57, 72, 87, 102, 117 минут) из хвостовой вены отбирали кровь в пробирки с гепарином и интенсивно перемешивали для предотвращения свертывания крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунке 2 представлена хроматограмма смеси ГК и ГА. Из рисунка видно, что пики веществ при подобранных хроматографических условиях (условия смотри в разделе материалы и методы) хорошо разделены.

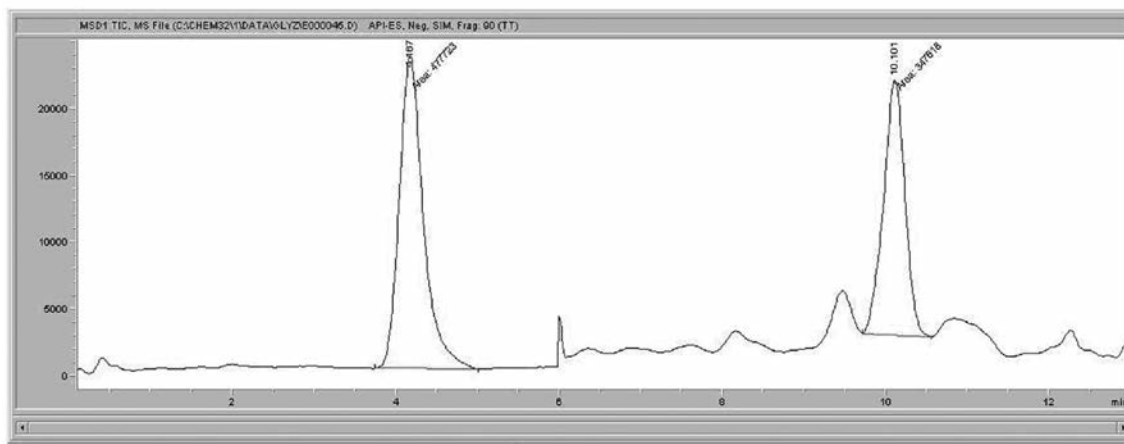


Рисунок 2.

Хроматограмма смеси глицирризиновой и глицирретовой кислот.
Время удерживания глицирризиновой и глицирретовой кислот составляет 4,17 мин и 10,10 мин соответственно.

Для доказательства правомерности использования ГА в качестве внутреннего стандарта для определения ГК нами были проведены эксперименты по определению ГА в динамике после перорального введения крысам глицирризиновой кислоты в дозе 50 мг/кг. Калибровочная зависимость для определения ГА в крови линейная в диапазоне концентраций от 10 до 1000 нг ГА/мл крови и описывается уравнением $y=115,9 \times x + 1510$. Коэффициент корреляции составляет 0,9995. Кровь для анализа отбирали из хвостовой вены через 0,5, 1, 2, 3, 5, 8, 10 (или 12), 24 часа после перорального введения ГК. На рисунке 3 приведены хроматограммы образцов крови крысы через 30 минут (А) и 10 часов (В) после введения ГК. Из рисунка 3 видно, что в первые минуты в крови обнаруживается ГК, но нет ГА. По истечении 10 часов пик, соответствующий ГК практически отсутствует, при этом наблюдается появление пика, соответствующего ГА.

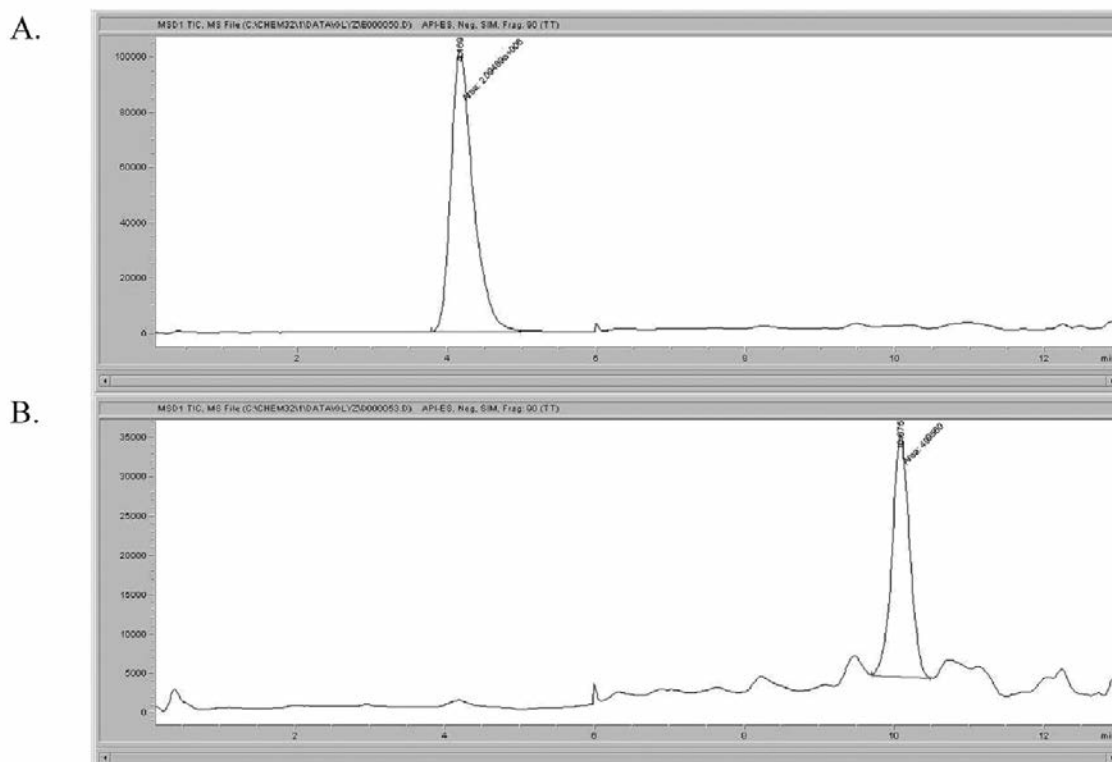


Рисунок 3.

Хроматограммы образца крови крысы через 30 минут (А) и через 10 часов (В) после однократного перорального введения ГК в виде натриевой соли при дозе 50 мг/кг.

Динамика изменения содержания ГА в крови животных представлена на рисунке 4.

Из рисунка 4 видно, что максимальная концентрация метаболита наблюдается через 12 часов после перорального введения ГК. Через 2 часа после введения ГК (в дозе 50 мг/кг) содержание глицирретовой кислоты в крови составляет 10,1 нг/мл. Следовательно, при дозе 8,5 мг ГК/кг ошибка её определения за счёт появления эндогенной глицирретовой кислоты составляет менее 0,2%. Таким образом, использование глицирретовой кислоты в качестве внутреннего стандарта для повышения точности количественного определения глицирризиновой кислоты в интервале от 0 до 120 минут после её перорального введения является правомерным.

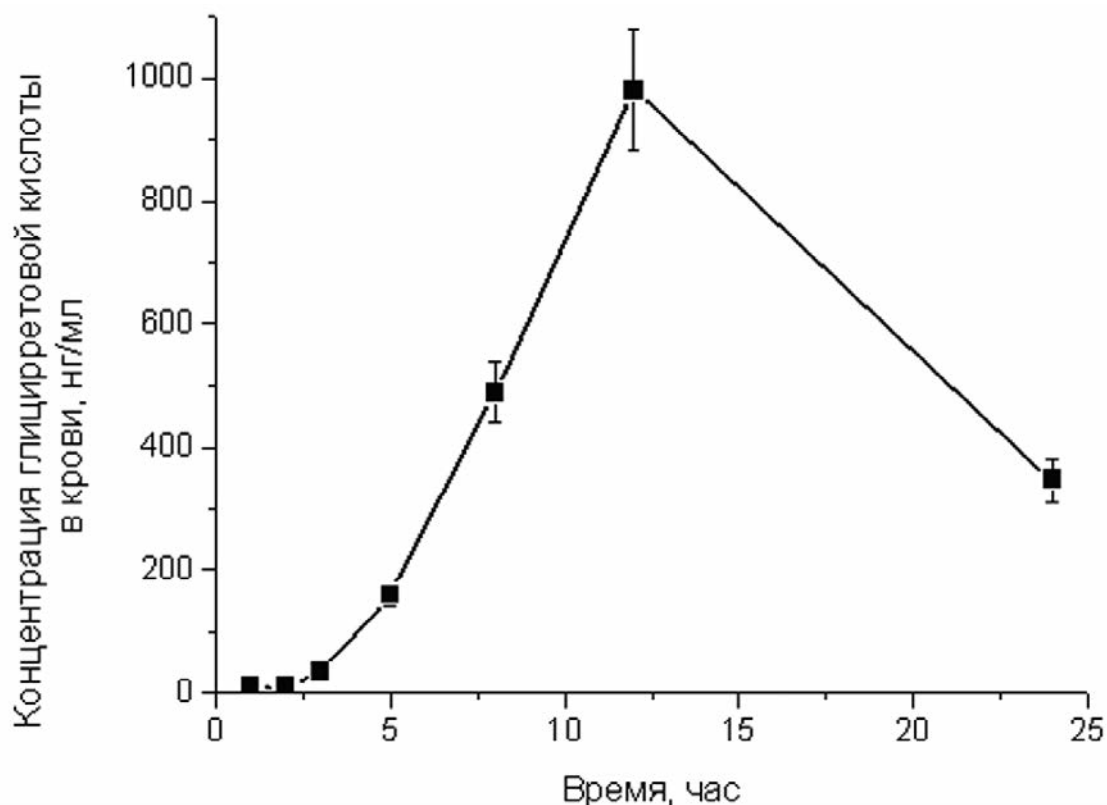


Рисунок 4.

Динамика изменения содержания глицирретовой кислоты при пероральном введении крысам натриевой соли глицирризиновой кислоты (50 мг ГК/кг).

Калибровочную зависимость для последующего определения ГК получали, титруя образцы крови крыс заданным количеством ГК и добавляя во все образцы внутренний стандарт – ГА. Количественное определение глицирризиновой кислоты с помощью масс-спектрометрической детекции осложняется тем обстоятельством, что до введения ГК в крови всех обследованных животных обнаруживается пик, соответствующий по массе ($m/z=821,3$) и времени удерживания глицирризиновой кислоте. В дальнейшем эту величину рассматривали как исходный уровень и учитывали при построении калибровочной зависимости и кинетических кривых, описывающих содержание ГК в крови после её перорального введения. За вычетом исходного уровня (нулевая концентрация ГК) калибровочная зависимость отношения площадей пиков ГК и ГА от концентрации ГК в крови линейна в интервале концентраций от 50 до 5000 нг ГК /мл крови и описывается уравнением: $y=0,448 \times x + 0,1607$. Коэффициент корреляции составляет 0,995. Предел обнаружения метода 25 нг/мл крови, нижний предел количественного определения 50 нг/мл крови. Следует отметить, что чувствительность метода ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием обычно составляет в эквивалентных условиях (объем крови, размер колонки) 2×10^5 нг/мл. Сходимость разработанной аналитической методики, выражающая степень близости результатов для серии измерений различных проб одного и того же однородного образца, более 97%. Таким образом, по отношению площадей пиков ГК и ГА (внутренний стандарт) для исследуемого образца, используя полученную зависимость, можно определить содержание ГК в нём.

Сведения, имеющиеся в литературе по всасыванию ГК при её пероральном введении, достаточно противоречивы. Так, с одной стороны, в работе [8] показано, что при дозе 100 мг/кг (в 12 раз превышающей использованную нами) появление ГК в крови животных наблюдается в течение первого часа после её перорального введения совместно с веществами, способствующими увеличению всасывания. С другой стороны, в работе G. Cantelli-Forti et al. [7] максимум всасывания ГК при введении доз, существенно превышающих терапевтические, наблюдали только через 10 часов. Разработанный нами метод количественного определения ГК в крови подопытных животных с использованием ГА в качестве внутреннего стандарта был применен для сравнения эффективности всасывания глицирризиновой кислоты в составе лекарственного препарата “Фосфоглив” и раствора натриевой соли ГК (ГК-Na) в первые два часа после их перорального введения. Вводимая доза составляла 8,5 мг ГК /кг. Кинетика изменения содержания ГК в крови подопытных животных приведена на рисунке 5.

Из рисунка 5 видно, что максимальная концентрация ГК в крови $C_{\text{макс.}}(\text{ГК})$, при введении “Фосфоглива” выше, чем при введении ГК-Na в той же дозе; величина AUC(110), рассчитанная по методу трапеций, для ГК приблизительно в 2 раза меньше, чем для “Фосфоглива”.

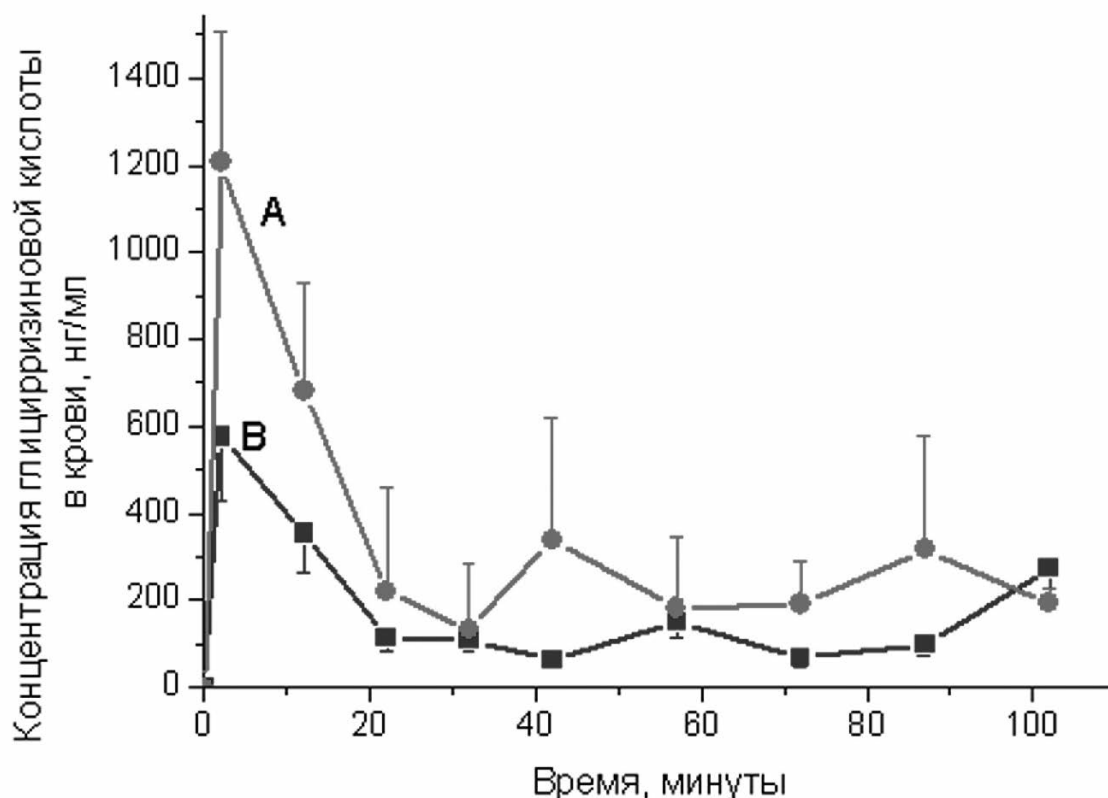


Рисунок 5.

Кинетика изменения содержания ГК в крови подопытных животных после перорального введения препарата “Фосфоглив” (А) и раствора натриевой соли глицирризиновой кислоты (В) при дозе 8,5 мг ГК/кг.

В работе [12] на перфузированном кишечнике крысы показано увеличение проницаемости кишечной стенки для ГА в присутствии фосфолипидов. Для ГК авторы не получили статистически значимого различия в проницаемости без фосфолипидов (ФЛ) и в их присутствии. Скорее всего, это связано с тем, что при простом введении в перфузат фосфолипидов может происходить

ОСОБЕННОСТИ ВСАСЫВАНИЯ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ

спонтанное эмульгирование ГА (но не ГК) и образование смешанных частиц ГА-ФЛ, для которых проницаемость выше. Препарат “Фосфоглив” представляет собой наноэмульсию с размером частиц менее 50 нм, в состав которой входит фосфатидилхолин и глицирризиновая кислота. Смешанные наночастицы ФЛ-ГК получаются в процессе гомогенизации при высоком давлении. Возможно, именно за счёт этого увеличивается всасывание ГК при пероральном ее введении в составе препарата “Фосфоглив”.

Таким образом, нам впервые удалось обнаружить глицирризиновую кислоту в крови в первые минуты после перорального введения препаратов, её содержащих, в терапевтической дозе и показать бóльшую её биодоступность в составе препарата “Фосфоглив”.

ВЫВОДЫ. Разработан метод определения глицирризиновой и глицирретовой кислот в крови с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. Метод применен для исследования фармакокинетики ГК и ГА на лабораторных животных при дозе 8,5 мг/кг. Показано, что всасывание ГК наблюдается уже в первые 15 минут после перорального введения как ГК-Na, так и “Фосфоглива”. При этом после введения препарата “Фосфоглив” биодоступность глицирризиновой кислоты значительно выше, чем после введения раствора ГК-Na, что может быть связано с повышением всасывания ГК в составе фосфолипидных наночастиц. Кроме того, предложенный метод позволяет одновременно анализировать содержание в крови как ГК, так и её основного метаболита – глицирретовой кислоты. Для анализа необходимо не более 70 мкл крови без предварительного освобождения от форменных элементов. Таким образом, предложенный метод может быть использован для фармакокинетических исследований препаратов, содержащих ГК.

Данная работа финансировалась из средств Гос. контракта № 02.522.11.2011.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ипатова О.М.* (2005) Фосфоглив: механизм действия и применение в практике, Издательство ГУ НИИ БМХ РАМН, М.
2. *Als M., Hosseinzaden H.* (2008) *Phytother. Res.*, **22**, 709-724.
3. *Buhler H., Perschel F.H., Fitzner R., Hierholzen K.* (1994) *Steroids*, **59**, 131-135.
4. *Ploeger B., Mensinga T., Sips A., Seinen W., Meulenbelt J.* (2001) *Drug Metabol. Rev.*, **33**(2), 125-147.
5. *Takeda S., Ishihara K., Wakui Y., Amagaya S., Maruno M., Akao T., Kobashi K.* (1996) *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**(9), 902-905.
6. *Akao T., Hayashi T., Kobashi K., Kanaoka M., Kato H., Kobayashi M., Takeda S.* (1994) *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**(2), 135-137.
7. *Cantelli-Forti G., Maffei F., Hrelia P., Bugamelli F., Bernardi M., D'Intino P., Maranesi M.* (1994) *Environmental health perspectives*, **102**(9), 65-68.
8. *Sasaki K., Yonebayashi S., Yoshida M., Shimizu K., Aotsuka T., Takayama K.* (2003) *Int. J. Pharmaceutics*, **265**, 95-102.
9. *Lin Z.J., Qiu S-X., Wufuer A., Shum L.* (2005) *J. Chromatogr. B*, **814**, 201-207.
10. *Игнатов Д.В., Прокофьев Ю.И., Ипатова О.М., Тимофеев В.П., Медведева Н.В., Мишагин А.Ю.* (2003) *Биоорганическая химия*, **29**, 429-433.
11. *Koga K., Kawashima S., Shibata N., Takada K., Murakami M.* (2003) *Biol. Pharm. Bull.*, **26** (9), 1299-1305.
12. *Zhou L., Yang J., Zhang X.Y., Liu X.Q., Wang G.J.* (2008) *Yao Xue Xue Bao*, **43**, 71-75.

Поступила: 08. 12. 2009.

**THE ABSORPTION FEATURES OF GLYCYRRHIZIC ACID IN COMPOSITION
OF DRUG “PHOSPHOGLIV”**

A.A. Voskresenskaya, N.V. Medvedeva, V.N. Prozorovskiy, N.E. Moskaleva, O.M. Ipatova

Institute of Biomedical Chemistry of RAMS, Pogodinskaya str.10, Moscow, 119121 Russia;
tel.: +7-495-708-38-07; e-mail: voskresenskaya_a@mail.ru

Glycyrrhizic acid (GL) – one of the active components of the Russian drug formulation “Phosphogliv” possesses extremely low bioavailability. A sensitive method for GL determination in blood using high performance liquid chromatography coupled with mass-spectrometry (HPLC-MS) has been developed in order to investigate absorption characteristics of glycyrrhizic acid after peroral administration of “Phosphogliv” and GL sodium salt. Separation of blood components was achieved on the analytical reverse-phase column C18 “EcoNova” ProntoSIL, using a gradient mode. Detection of GL and an internal standard (IS) (glycyrrhetic acid) was performed using electrospray ionization with the selected ion monitoring in negative mode (SIM) using target ions at m/z 821.3 for GL and 469.3 for IS. The calibration curve was linear over the range of 50-5000 ng/ml (the correlation coefficient was 0.995). The detection limit for GL in blood was 25 ng/ml and the lower limit of quantification was 50 ng/ml.

The developed method has been applied to compare absorption efficiency of glycyrrhizic acid as the component of “Phosphogliv” composition and solution of GL sodium salt during first two hours after their single peroral administration to rats at the dose of 8.5 mg/kg. It was shown that GL absorption occurs several minutes after peroral administration. Moreover, GL bioavailability after administration of drug “Phosphogliv” was higher than after administration of GL sodium salt. This difference may be attributed to incorporation of glycyrrhizic acid in the phospholipid nanoparticles structure.

Key words: drug bioavailability, “Phosphogliv”, monitoring, LC-MS, glycyrrhizic acid, glycyrrhetic acid.