Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.
Biomed. Chromatogr. **20**: 1260–1266 (2006)
DOI: 10.1002/bmc

BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY
Biomed. Chromatogr. **20**: 1260–1266 (2006)
Published online 1 August 2006 in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/bmc.693

Определение содержания пицеида в плазме и тканях крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением ультрафиолетового излучения

Chunyan Lv, Lantong Zhang,* Qiao Wang, Weina Liu, Chunying Wang, Xiujuan Jing and Yang Liu
Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, People's Republic of China
Received 4 April 2006; accepted 11 May 2006

АННОТАЦИЯ: Был разработан быстродействующий чувствительный и селективный метод анализа HPLC. Была проверена точность, с которой этим методом определяется содержание пицеида в плазме крови и тканях крысы. Это лекарственное вещество было выделено из плазмы крови и тканей путем простой процедуры осаждения протеинов. Хроматографическое отделение было выполнено на колонке C_{18} с применением водного раствора ацетонитрила (26:74, в объемном отношении) в качестве мобильной фазы. Этот метод был успешно применен для исследования фармакокинетики и распространения пицеида по тканям после приема в рот дозы пицеида в 50 мг/кг. Для экспериментов использовались здоровые самцы крыс Уистар. Фармакокинетические параметры показали, что пицеид быстро абсорбируется, распространяется и через 4 часа после приема в рот исчезает из организма. Результаты распространения в тканях показали, что через 10 минут концентрация пицеида достигала пикового уровня в большинстве тканей, за исключением сердца и яичек. Наиболее высокий уровень пицеида был обнаружен в желудке, затем в тонком кишечнике, селезёнке, легких, мозге, яичках, печени, почках и сердце. Содержание пицеида в яичках и сердце достигало пика через 30 минут. Через 120 минут содержание пицеида во всех тканях снижалось до низкого процента первоначальной концентрации. Пицеид абсорбировался через желудочно-кишечный тракт; значительная абсорбция происходила в желудке и тонком кишечнике. Долговременного накопления пицеида в тканях крыс не наблюдалось. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пицеид; HPLC; фармакокинетика; распространение

Использованные сокращения: HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены человека; LLC - карцинома легкого Льюис.

ВВЕДЕНИЕ

Пицеид (ресвератрол-глюкозид), транс-3,5,4′-тригидроксил-стильбен-3-моно-D-глюкозид, фенольное соединение, обильно присутствует в лечебных травах и красном вине. Его химическая структура показана на рис. 1.

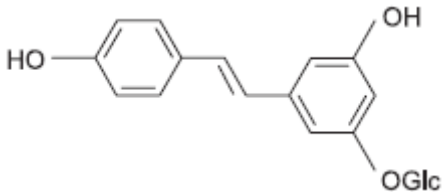

Рис. 1. Химическая структура пицеида.

Наличие в вине пицеида и его агликона приобретает актуальность из-за его ожидаемой связи с низкой заболеваемостью сердечнососудистыми заболеваниями. Кроме того, все возрастающую важность пицеид приобретает в качестве хемопревентивного противоракового средства. Сообщалось, что пицеид может усиливать сократимость клеток миокарда, что может быть связано с повышением внутриклеточной

концентрации кальция (Jin et al., 2000). В другом исследовании указывалось, что пицеид может также снижать/ингибировать слипание кровяных телец (Zhang et al., 1995; Shan et al., 1990), сокращать синтез тромбоксана (Shan et al., 1990; Wang et al., 1995), ингибировать сосудистые спазмы (Gao et al., 2004), ингибировать синтез эйкозаноидов (Kimura et al., 1985), и, кроме того, пицеид может осуществлять захват свободных радикалов (Cuendet et al., 2000). Сообщалось и об антираковом действии пицеида (Jang et al., 1997; Wang et al., 2003). В ходе своего исследования Kimura et al. (2000) обнаружили, что стильбен-глюкозиды, выделенные из лечебных растений и, в частности, винограда, могут ингибировать рост опухолей и останавливать уже широко распространившиеся по тканям метастазы у мышей с карциномой легких Льиса (LLC). Они также исследовали ингибиторное действие стильбен-глюкозидов на дифференциацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC), которая ведет к образованию капиллярной сети. Эти результаты указывают на то, что анти-опухолевая и анти-метастатическая активность стильбен-глюкозидов, пицеида и 2,3,5,4′-тетрагидроксистильбен-2-OD-глюкозида, может быть обусловлена ингибированием синтеза ДНК в клетках LLC и ангиогенезом HUVEC.
Для определения содержания пицеида в биообразцах в исследовании *in vivo*, судя по сообщениям, существует только один метод - HPLC-УФ (Lin et al., 2001). Этот метод требует или много времени в связи с длительностью хроматографической процедуры или больших объемов плазмы крови. В этой статье, описывается более быстрый и чувствительный метод анализа – RP HPLC, позволяющий определять содержание пицеида в плазме крове и тканях крыс. После валидации этот метод был успешно применен для определения содержания фармакокинетиков в тканях, а также в исследовании распространения пицеида по тканям здоровых крыс Уистар после единичного приема в рот дозы в 50 мг/кг.

ЭКСПЕРИМЕНТЫ

Реагенты

Пицеид был предоставлен Национальным институтом контроля фармацевтической и биологической продукции (Пекин, Китай). Ацетонитрил уровня HPLC и метанол были приобретены у компании Tedia (Tedia Company, Inc. USA). Вода была очищена путем двойной дистилляции.

Аппарат

Использовалась высокопроизводительная система жидкостной хроматографии, состоявшая из насоса Waters 1525, детектора поглощения на двух длинах λ-волн Waters UV 2487 и «Пульта управления Исследовательского проекта Waters».

Условия проведения хроматографического исследования

Использовалась колонка Diamonsil C18 (5 μm, 250 x □4.6 мм (внутренний диаметр)). Температура в колонке поддерживалась на уровне 30°C. Мобильная фаза состояла из изократической системы растворителей: ацетонитрила и воды (26:74, в объемном отношении). Скорость потока составляла 1.0 мл/мин. Длина волны УФ детектора была установлена на значение 306 нм.

Исходные растворы и эталоны

Исходный раствор пицеида был подготовлен в метаноле в концентрации 15.52 мг/мл. Калибровочные маркёры пицеида были приготовлены путем маркировки пустых биообразцов соответствующими количествами пицеида. Были получены релевантные концентрации в диапазоне от 0.056 до 1552.00 μг/мл. Были также приготовлены контрольные образцы низкой, средней и высокой концентрации в соответствии с оцениваемыми концентрациями во всех биообразцах.

Все исходные растворы, эталоны и контрольные образцы для определения качества были приготовлены в массовом порядке, расфасованы аликвотами по отдельным пробиркам, и далее их хранение выполнялось при температуре −20°C.

Животные

Самцы крыс Уистар (весом 300±□50 г, в возрасте 5–6 месяцев, сертификат № DK 0505019) были приобретены в «Экспериментальном центре разведения животных» провинции Hebei (Китай). Животные содержались в помещении с контролируемыми параметрами окружающей среды с соблюдением 12-часового цикла освещения (свет-тьма). Их кормили стандартной лабораторной пищей и водой *ad libitum* (в неограниченном количестве). В день экспериментальной обработки крыс, пища была убрана из клеток за 8 часов до начала эксперимента. Все протоколы и процедуры были разрешены к применению китайским «Институтским комитетом контроля ухода за животными и их использования».

Прием лекарства и взятие образцов

Была получена суспензия пицеида в 0.5% растворе CMC-Na (натрий-карбокси-метил-целлюлоза). Эту суспензию крысы получали в рот дозой 50 мг/кг. Для исследования фармакокинетических параметров брались образцы крови из яремной вены в соответствии с особым графиком (5, 10, 15, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 и 240 минут после приема дозы). Для исследования распространения вещества по тканям 18 крыс были случайным образом распределены по трем группам, и все они получили пицеид в рот в дозе 50 мг/кг. Через 10, 30 и 120 минут после приема пицеида в рот извлекались для анализа сердце, печень, селезёнка, легкие, почки, желудок, тонкий кишечник, мозг и яички.

Подготовка биообразцов

Образцы плазмы.

К 100 µл плазмы крови добавлялось 300 µл метанола. Смесь перемешивалась в вихревой воронке в течение 10 секунд. После центрифугирования на частоте 10 000 об/мин в течение 5 минут 20 µл супернатантного слоя впрыскивались в систему HPLC для анализа.

Образцы тканей.

Аликвоты по 500 мг образцов тканей гомогенизировались в двух пробирках в нормальном физиологическом растворе в ледяной ванне. В 100 µл гомогената ткани добавлялось 300 µл метанола. Затем содержимое пробирки перемешивалось в вихревой воронке в течение 10 секунд, и смесь центрифугировалась на частоте 10 000 об/мин в течение 5 минут. Аликвота супернатантного слоя, составлявшая 20 µл, впрыскивалась в систему HPLC для анализа.

Фармакокинетический анализ.

Был выполнен не-компартментный (без использования камерной модели) фармакокинетический анализ данных концентраций пицеида в зависимости от времени. Такие фармакокинетические параметры, как максимальная концентрация в плазме (C_{max}) и время до достижения пикового значения (T_{max}), были получены непосредственно на освнове экспериментальных данных по концентрации пицеида в плазме крови в различные моменты времени. Константы скорости исчезновения лекарства в организме (K_{el}) определялись по линейной регрессии логарифмической трансформации данных последних четырех точек на кривой. Средний полупериод исчезновения пицеида ($T_{1/2}$) вычислялся в соответствии со следующим уравнением: $T_{1/2}$ = □0.693/K_{el}. Площадь области под кривой зависимости концентрации пицеида в плазме от времени вплоть до последнего значения времени (t) (AUC_{0-t}) определялась с помощью правила трапеции. Значения $AUC_{0-\infty}$ вычислялись путем добавления к AUC_{0-t} значения C_t/K_{el}. Объем распределения (V_d) вычислялся с помощью уравнения: V_d = □D x □K_{el}/AUC, в котором D – это доза. Полное исчезновение (полный клиренс) (CL)

вычислялось с помощью уравнения CL = □D/AUC.

Анализ распространения пицеида по тканям.

Количественное содержание пицеида в тканях было получено из пиковых амплитуд на кривых поглощения пицеида. Наблюдаемая концентрация (C_o) вычислялась на основе калибровочных кривых. Концентрация массы пицеида (C_m) в образцах ткани вычислялась в соответствии со следующим уравнением: C_m (μг/г) = □C_o (μг/мл) x □2 (мл/г). В соответствии с полученными данными была построена столбчатая диаграмма содержания пицеида в тканях в различные моменты времени после приема пицеида в рот.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Специфика

Пустые биообразцы, содержащие гепарин (n = □6), были протестированы на наличие посторонних пиков (помех). На рис. 2 и 3 показаны репрезентативные хроматограммы пустых биообразцов и биообразцов, маркированных наличием эталонного раствора пицеида. Пицеид был хорошо отделен от эндогенных веществ на биообразцах, и время удержания его пиковых значений составляло приблизительно 5.8 минут.

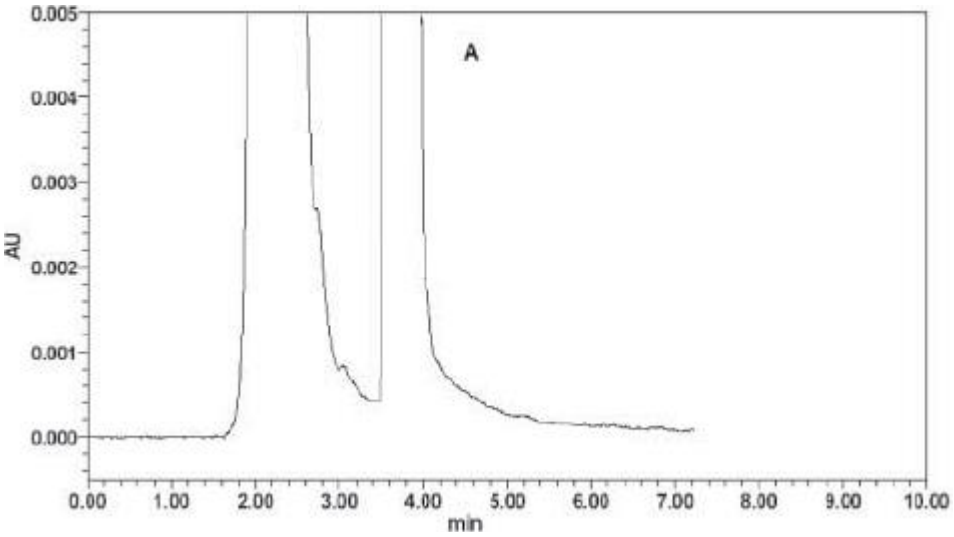

Рис. 2 A

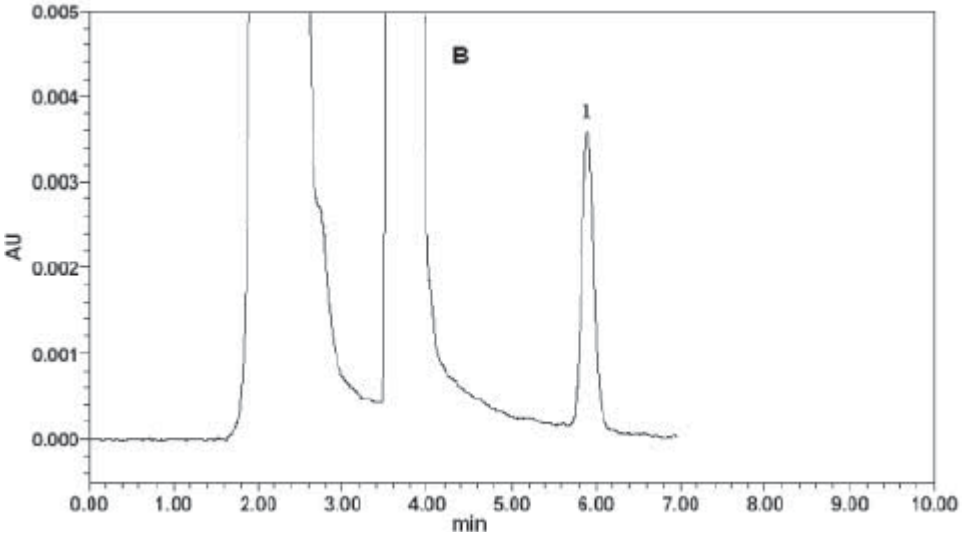

Рис. 2 B

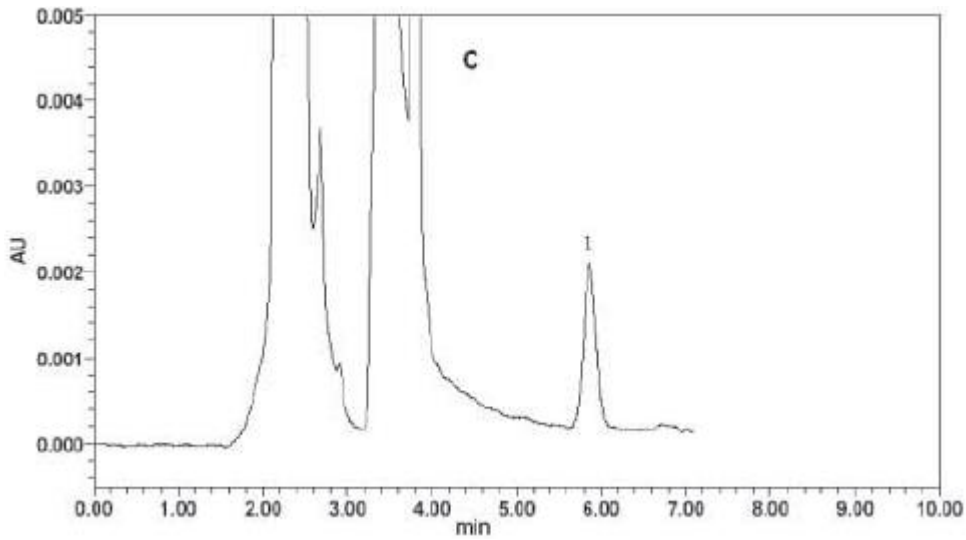

Рис. 2 C

Рис. 2. Типичные хроматограммы пицеида в плазме крови.

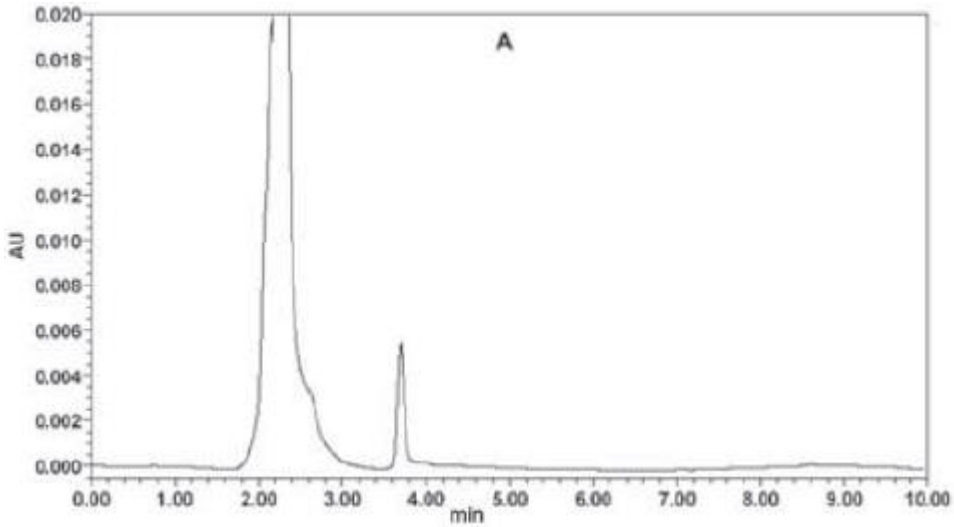

Рис. 3 A

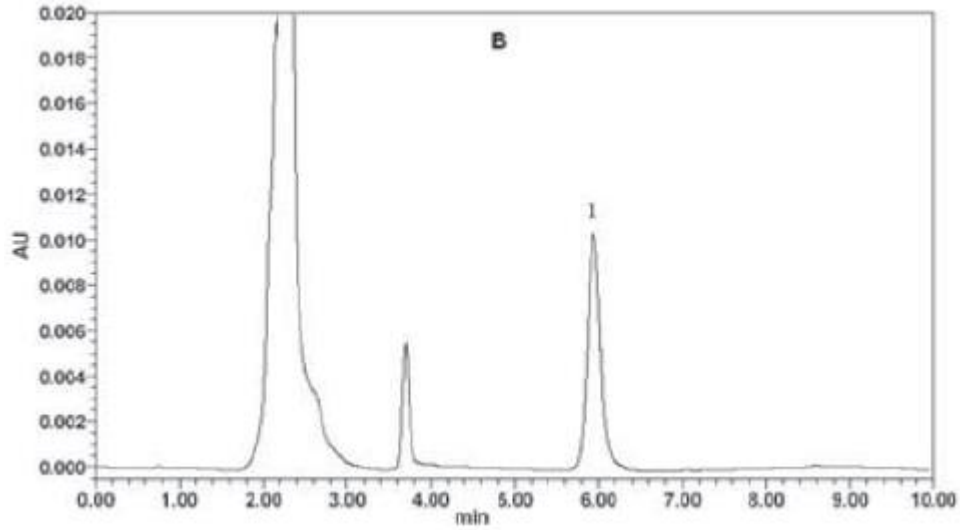

Рис. 3 B

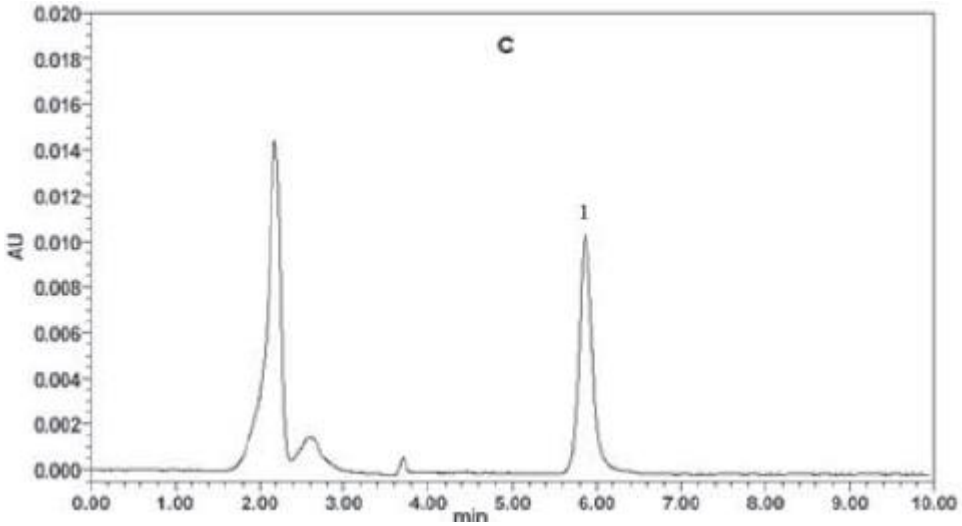

Рис. 3 С

Рис. 3. Типичные хроматограммы пицеида в ткани сердечной мышцы.

Количественные пределы содержания пицеида и линейность

Стандартные пиковые значения концентрации (С) по оси Y на кривых приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Стандартные кривые, коэффициенты корреляции и линейный диапазон значений содержания пицеида в биообразцах

Биообразцы	Стандартные кривые	Коэффициенты корреляции	Линейные пределы значений содержания пицеида (μг/мл)
Плазма	$Y = 17.0184C - 166.1259$	0.9983	0.056–11.200
Сердце	$Y = 18.9154C - 667.2895$	0.9990	0.075–24.25
Печень	$Y = 17.8260C - 46.2141$	0.9975	0.075–48.50
Селезёнка	$Y = 20.0912C - 1670.6715$	0.9994	0.075–121.25
Легкие	$Y = 19.9521C - 1425.2913$	0.9963	0.075–97.00
Почки	$Y = 18.4394C - 40.1397$	0.9966	0.075–48.50
Желудок	$Y = 18.2402C - 129.8087$	0.9996	0.606–1552.00
Тонкий кишечник	$Y = 18.0042C - 70.1202$	0.9995	0.606 –776.00
Мозг	$Y = 19.1684C - 794.0444$	0.9977	0.075– 48.50
Яички	$Y = 17.9942C - 46.4165$	0.9954	0.075 – 606.25

Изменения концентрации с течением времени были линейными в определенном диапазоне для всех биообразцов с коэффициентом корреляции (r^2), превышающим значение 0.9900. Нижний лимит количественных значений (LLOQ) концентрации пицеида в образцах был определен как 50 нг/мл в плазме, 25 нг/мл в сердце, 30 нг/мл в печени, 70 нг/мл в селезёнке, 40 нг/мл в легких, 75 нг/мл в почках, 60 нг/мл в желудке, 110 нг/мл в тонком кишечнике, 60 нг/мл в мозге и 30 нг/мл в яичках.

Точность и аккуратность эксперимента

Оценивалась воспроизводимость эксперимента и внутренняя точность. Эта оценка выполнялась на подготовленных заранее контрольных образцах низкого, среднего и высокого качества. Внутренняя точность экспериментов (измеряемая как относительное стандартное отклонение - RSD), проведенных с разрывом в одну неделю, составляла 2.4–10% в плазме, 3.7–8.6% в сердце, 1.5–5.4% в печени, 3.6–6.5% в селезёнке, 2.9–8.3% в легких, 1.8–4.3% в почках, 1.9–9.2% в желудке, 2.5–9.2% в тонком кишечнике, 4.6–5.8% в мозге и 1.4–7.5% в яичках. Воспроизводимость эксперимента, оцененная на контрольных образцах низкого, среднего и высокого качества, была в допустимом диапазоне. Внутренняя точность эксперимента (измеряемая как RSD) была в диапазоне от 1.8 до 7.6%, а между экспериментами

точность, ранжируемая по всей шкале валидных значений, составляла 1.6–9.8 для контрольных образцов низкого качества, 1.1–10.4 для среднего качества и 0.1–8.6% для высокого качества. Все значения были ниже 15% порога, установленного «Национальной комиссией китайской фармакопеи», 2005.

Восстановление

Анализ восстановления проводился по маркированным пицеидом биообразцам. Восстановление вычислялось путем сравнения пиковой концентрации пицеида в экстрактах-биообразцах с контрольными образцами низкой, средней и высокой концентрации. Значения среднего восстановления пицеида (среднее ± стандартное отклонение) составляли: 83.90 ± 0.45, 88.07 ± 1.86 и 90.31 ± 3.14% (n=6) в плазме крови, а среднее восстановление во всех образцах тканей превышало 85.0%.

Стабильность

Стабильность пицеида в биообразцах исследовалась в различных условиях хранения и обработки биообразцов. Результаты сравнивались со свежеприготовленным набором образцов, предназначенных для контроля качества. Значение параметра RSD каждого набора образцов находился в приемлемых для метода пределах (<15%). Кроме того, исходные растворы пицеида в плазме были стабильны после прохождения трех циклов замораживания-оттаивания (данные не показаны) в течение, по меньшей мере, 6 часов.

Фармакокинетические параметры

Кривая зависимости концентрации пицеида в плазме от времени показана на рис. 4.

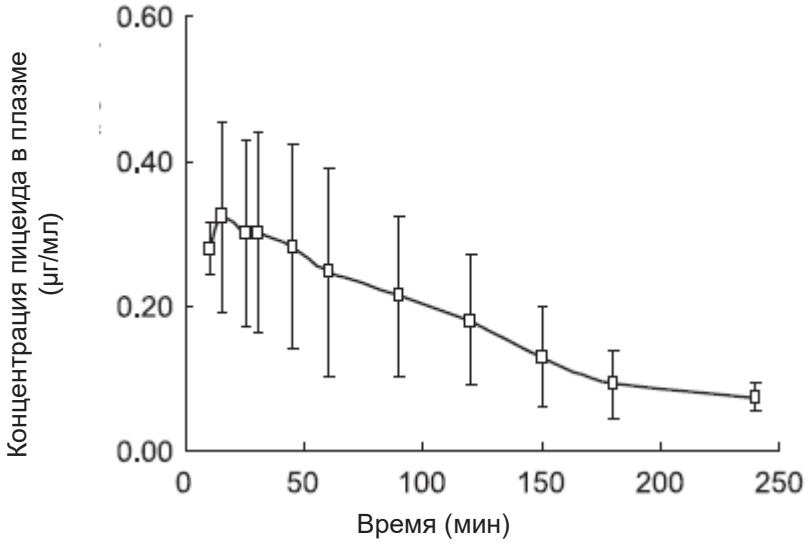

Рис. 4. Профиль зависимости концентрации от времени после приема пицеида в рот (среднее ± SD).

Максимальная концентрация пицеида достигалась через 20.83 ± 8.61 минут. Кривая показывает фазу медленного распространения и фазу медленного заключительного исчезновения пицеида, длящуюся до момента времени 240 минут после приема пицеида в рот.

Пиковая концентрация пицеида в плазме составляла 0.364 ± 0.151 μг/мл. Основные фармакокинетические параметры распространения пицеида по тканям у крыс после приема в рот приведены в Таблице 2.

Таблица 2.
Фармакокинетические параметры распространения пицеида после единичного приема в рот у крыс

Параметры	C_{max} (µг/мл)	T_{max} (мин)	$T_{1/2}$ (мин)	K_{el} (мин$^{-1}$)	V_d (л/кг)	CL (л/кг/мин)	AUC_{0-t} (µg мин/мл)	$AUC_{0-\infty}$ (µg мин/мл)
Пицеид	0.364±0.151	20.83±8.16	100.57±17.05	0.016±0.003	73.61±35.89	1.20±0.37	41.78±15.15	52.26±16.18

C_{max} – максимальная концентрация в плазме; T_{max} – время достижения C_{max}; $T_{1/2}$, полупериод исчезновения; K_{el} – константа исчезновения; V_d объем распределения; CL – полный клиренс; AUC_{0-t} – площадь под кривой (концентрация-время) от 0 до момента последнего взятия образца; $AUC_{0-\infty}$, - площадь под кривой (концентрация-время) от 0 до бесконечности. Данные приведены как средние значения ±SD (n=6).

Распространение пицеида в тканях

Пицеид был обнаружен в различных органах через 10 минут после приема в рот. Концентрация пицеида достигала пикового уровня во всех тканях за исключением сердца и яичек. Наиболее высокий уровень был обнаружен в желудке, затем в тонком кишечнике, далее в селезёнке, легких, мозге, яичках, печени, почках и сердце. Через 30 минут наиболее высокая концентрация пицеида все еще наблюдалась в желудке. Затем, тем не менее, концентрация стремительно падала со значений 168.79±77.45 до 72.76 ±32.68 µг/г. Содержание пицеида в тонком кишечнике также сокращалось до почти 28.03% от первоначальной концентрации. Содержание пицеида в яичках достигало пикового уровня 29.08±12.12 µг/г. В других органах содержание пицеида уменьшалось до некоторого уровня за 30 минут. Через 120 минут пицеид все еще присутствовал в желудке в относительно высоких концентрациях. Концентрации пицеида в различных органах показаны в Таблице 3.

Таблица 3. Абсолютная количественная оценка содержания пицеида в органах пищеварительного тракта крыс после единичной дозы при приеме в рот

	Концентрация (µг/г)		
Ткани	10 мин	30 мин	120 мин
Сердце	0.50± 0.26	4.95± 2.54	0.23±0.07
Печень	4.47± 2.51	0.53± 0.33	0.27±0.11
Селезёнка	28.03±13.81	3.74± 1.51	0.47±0.18
Легкие	10.42± 3.86	2.88± 1.04	0.72±0.37
Почки	2.58± 1.19	0.82± 0.25	0.52±0.29
Желудок	168.79±77.45	72.76±32.68	5.52±2.87
Тонкий кишечник	108.66±29.79	30.46±16.63	2.72±1.34
Мозг	6.07± 2.85.	4.14± 2.72	0.33±0.13
Яички	5.30± 2.40	29.08±12.12	0.56±0.28

Столбчатая диаграмма содержания пицеида в тканях в различные моменты времени после приема в рот показана на Рис. 5.

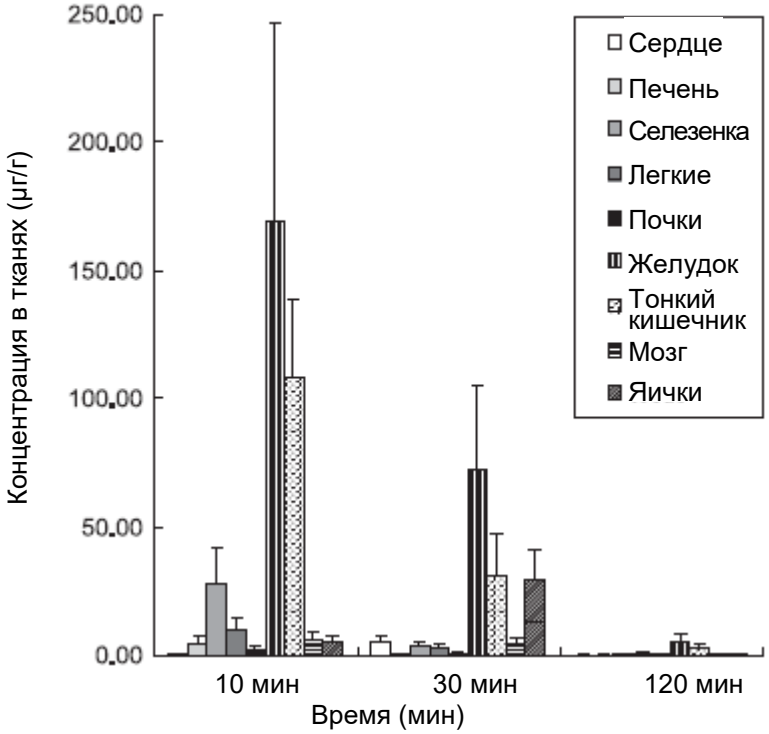

Рис. 5. Концентрации пицеида в тканях в различные моменты времени после приема в рот (среднее значение ±□ SD, n=□6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения содержания пицеида в биообразцах был разработан и отлажен анализ HPLC. Данный биоаналитический метод включает в себя простую процедуру осаждения протеинов и обратную фазу анализа HPLC с применением УФ-детектора. Метод продемонстрировал адекватную специфичность и чувствительность при определении содержания пицеида в плазме крови и образцах тканей крыс вслед за единичным приемом в рот дозы пицеида 50 мг/кг.

В настоящее время исследование фармакокинетических параметров и распределение пицеида в тканях плохо документировано, и отсутствуют сообщения об исследованиях при приеме пицеида в рот. В данном фармакокинетическом исследовании были получены основные параметры распространения пицеида по тканям у крыс после приема в рот.

Время достижения максимальной концентрации было относительно коротким: 20.83 ±□8.16 минут. Максимальная концентрация была 0.364±□0.151 μг/мл. Средний полупериод до исчезновения пицеида ($T_{1/2}$) составлял 100.57±□17.05 минут. Средний объем распределения пицеида составлял 73.61±35.89 л/кг, что гораздо выше среднего содержания жидкости во всем теле крысы. Это указывает на то, что у пицеида низкий коэффициент связывания лекарства и протеина плазмы, и большое количество пицеида может связываться с тканями. Результаты распространения пицеида в тканях подтверждают этот вывод. Полупериод исчезновения пицеида ($T_{1/2}$) составлял 100.57 ± 17.05 минут, а его полное исчезновение (полный клиренс) 1.20 ± □0.37 л/кг/мин, что указывает на быстрое исчезновение пицеида из тканей крыс. Параметр AUC_{0-t} составлял 41.78 ± □15.15 μг·мин/мл, а параметр $AUC_{0-\infty}$ 52.26 ± 16.18 μг·мин/мл.

Условия распространения пицеида по всем тканям крысы показывают, что пицеид диффундировал в большинство тканей непосредственно после приема в рот, и в течение следующих часов количество пицеида во всех тканях существенно уменьшалось. Пиковый уровень пицеида был отмечен через 10 минут после приема в рот в большинстве тканей, за исключением сердца и яичек. Максимальный уровень

пицеида был отмечен в желудке, 168.79 ± 77.45 μг/г через 10 минут. Через 30 минут уровень составлял приблизительно 43.11% от первоначальной концентрации, в то время как 2.50% пицеида оставалось в тканях даже через 120 минут после приема в рот. Через 10 минут уровень пицеида в тонком кишечнике был также относительно высок по сравнению с другими тканями и упал до почти 28.03% через 30 минут, что может быть, в основном, связано с методом приема лекарства (в рот). Отмечается, что среди тканей, не относящихся к пищеварительному тракту, высоким был уровень пицеида в селезёнке – концентрация 28.03 ± □13.81 μг/г через 10 минут. Распространение пицеида в мозге показало, что у пицеида есть способность пересекать барьер кровь–мозг при приеме в рот, что подтверждает предыдущие сообщения, что пицеид оказывает защитное действие при повреждениях мозга (Huang et al., 2005; Tian et al., 2003). Концентрация пицеида в яичках достигала пикового уровня через 30 минут, что показывает, что для пересечения барьера кровь–яички пицеиду требуется больше времени.

ВЫВОДЫ

Для определения содержания пицеида в биообразцах был разработан и отлажен анализ HPLC, который успешно применялся для исследования фармакокинетики и распространения вещества по тканям. Этот биоаналитический метод включает в себя простую процедуру осаждения протеинов и обратную фазу анализа HPLC с применением УФ-детекторов. Метод продемонстрировал адекватную специфичность и чувствительность при определении содержания пицеида в плазме крови и образцах тканей крыс вслед за единичным приемом в рот дозы пицеида 50 мг/кг. Короткое время проведения анализа и низкий порог обнаружения вещества делают этот метод идеальным для широкомасштабных предметных анализов, особенно когда образцы недоступны в более значительных количествах.
После приема в рот пицеид абсорбировался, распространялся по тканям и быстро исчезал. Основными органами, по которым распространялся пицеид у крыс, были желудочно-кишечный тракт (желудок, тонкий кишечник) и селезёнка. Было показано, что пицеид способен пересекать барьер кровь–мозг и барьер кровь–яички. Долговременное накопление пицеида в тканях крыс отсутствует.

Признательность
We gratefully acknowledge the technical support of the Experimental Apparatus Center of Hebei Medical University.

ЛИТЕРАТУРА