

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2014

Е. Б. Гузля

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ КВЕРЦЕТИНА И ДРУГИХ ФЛАВОНОЛОВ МЕТОДАМИ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ (ОБЗОР)

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований, Москва, Россия

В обзоре представлены современные аналитические методы, используемые при изучении фармакокинетики кверцетина и других флавонолов — биологически активных веществ, проявляющих различные терапевтические свойства. Рассмотрены варианты подготовки к анализу биологических жидкостей и тканей, условия хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования различных флавонолов в форме агликонов и гликозидов, а также их метаболитов. Приведены типичные примеры количественных определений концентраций флавонолов в биологических пробах, их масс-спектрометрической идентификации в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, при испытаниях как индивидуальных веществ, так и многокомпонентных растительных экстрактов.

Ключевые слова: кверцетин; флавонолы; флавоноиды; фармакокинетика флавоноидов; методы анализа биологических проб; жидкостная хроматомасс-спектрометрия.

Флавонолы — один из подклассов флавоноидов, разветвленного и обширного класса полифенольных соединений, среди которых флавонол кверцетин — один из наиболее распространенных и изученных. В качестве растительных пигментов эти соединения известны уже более 100 лет, но новая волна интереса началась в 1990-х гг. и была вызвана открытием антиоксидантных свойств флавоноидов — способности нейтрализовать свободные радикалы, с чем связаны их различные терапевтические свойства [1, 2].

Необходимая составляющая оценки механизмов возможного терапевтического или токсического воздействия биологически активного вещества — изучение его фармакокинетики (ФК) в организме человека и экспериментальных животных, т.е. поглощения, распределения, метаболизма и выведения. Для потенциальных лекарственных веществ параметры ФК связаны с эффективностью действия и режимом введения в организм для создания оптимальных концентраций.

В обзоре дана краткая характеристика свойств кверцетина и других флавонолов и рассмотрено развитие за последние 10 лет методов определения концентраций и идентификации флавонолов в биологических средах при изучении их ФК.

Структура, свойства и природные источники флавонолов

Флавоноиды являются вторичными метаболитами растений и объединены общностью путей биосинтеза; они ответственны за окраску плодов и листьев; осо-

бенно богаты ими покровные ткани растений [3]. Они принимают участие в фотосинтезе, в пролиферации и отмирания (путем апоптоза) клеток растений. Предполагается, что основная биологическая роль флавоноидов состоит в защите растений от агрессивных факторов внешней среды (УФ-излучение, инфекционные агенты).

Многообразие флавоноидов объясняется тем, что в растениях большинство из них присутствует в виде О- или С-гликозидов. В качестве агликона они содержат 15-углеродный скелет, основные элементы которого — два ароматических кольца, соединенных пирановым кольцом; последнее определяет, к какому из подклассов принадлежит тот или иной флавоноид. Классификация включает следующие подклассы: флавоны, флавонолы, флаваноны (катехины), антоцианидины, изофлавоны, флаванолы [4].

Кверцетин представляет подкласс флавонолов (рис. 1) — соединений с гидроксильной группой в третьей позиции и двойной связью С2-С3, содержит гидроксилы в положениях 3, 5, 7, 3', 4'. Другими представителями флавонолов являются кемпферол (гидроксилы в положениях 3, 5, 7, 4'), мирицетин (гидроксилы в положениях 3, 5, 7, 3', 4', 5'), морин (гидроксилы в положениях 3, 5, 7, 2', 4'), физетин (гидроксилы в положениях 3, 7, 3', 4') и др. [5]. Один из гидроксильных может быть метилирован или ацетилован; О-метилированные производные кверцетина — это рамнетин (по положению 7), изормнетин (по положению 3'), аза-леатин (по положению 5), тамариксетин (по положению

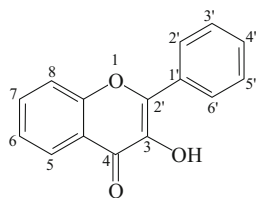


Рис. 1. Общая структурная формула флавонолов.

4'); О-метилированное производное кемпферола — кемпферид (по положению 4').

Гликозиды флавонолов (табл. 1) различаются положением, типом и количеством присоединенных гликозидных групп. О-гликозиды связываются через гидроксилы обычно в положении 3 или 7, С-гликозиды связываются с атомом углерода в положении 6 или 8. Чаще всего углеводные остатки — это рамноза, глюкоза и арабиноза [6].

Флавонолы содержатся во многих продуктах питания: луке, брокколи, чае, красном вине, оливковом масле, грейпфруте, различных ягодах — клюкве, клубнике, чернике и др. Считается, что в среднеевропейской диете их дневное потребление с пищей составляет 20 – 35 мг [7]. Флавонолы кверцетин и кемпферол обнаружены в составе лекарственных растений *Azadirachta indica*, *Cannabis sativa* (конопля посевная), *Desmodium canadense*, гликозиды флавонолов — в растениях *Bauhinia monandra*, *Ginkgo biloba*, *Acalypha indica*, *Betula pendula* (береза бородавчатая) и др. [8 – 10].

Основным механизмом антиоксидантной активности флавоноидов является способность непосредственно связываться со свободными радикалами, образуя при этом менее реакционноспособные соединения. Наиболее важными для антирадикальной активности кверцетина считаются следующие структурные элементы его молекулы [8]: 1) две ОН-группы в положениях С3' и С4', 2) двойная связь между атомами углерода 2 и 3 совместно с карбонильной группой в положении С4, необходимой для делокализации неспаренного электрона от В-кольца, 3) ОН-группы в положениях С3 и С5 совместно с карбонильной группой.

Кроме того, флавонолы, в особенности кверцетин, легко образуют комплексы с железом, что может объяснить изменение активности многих железосодержащих ферментов под действием кверцетина [11]. Таким образом, особенности строения молекулы кверцетина (наличие нескольких электронодонорных групп) опосредуют как выраженную антиоксидантную активность, так и способность влиять на синтез и активность различных ферментов, в частности, ингибировать медиаторы воспаления.

Флавонолы проявляют различные терапевтические эффекты [12]: противовоспалительный, нейропротекторный, антиатеросклеротический, антиканцерогенный и другие, причем противовоспалительный эффект является одним из основных и определяет другие эффекты.

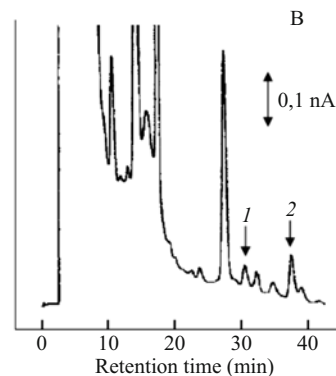


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограмма плазмы человека через 1 ч после приема зеленого чая: 1 — кверцетин (после ферментативного гидролиза конъюгатов), 2 — внутренний стандарт. Электрохимический детектор, остальные условия см. в табл. 2 [24].

Методы анализа биологических проб при изучении фармакокинетики флавонолов

Свойства и структура флавоноидов изучается уже более 70 лет. Интерес этот вполне объясним, учитывая широкий спектр их биологической активности. Параллельно с выявлением новых фармакологических свойств у различных представителей этого класса соединений увеличивается и количество работ, посвященных анализу биологических матриц растительного и животного происхождения с целью идентификации и количественного определения содержания флавоноидов и продуктов их метаболизма [13].

Исходные данные для расчета фармакокинетических параметров (абсолютной и относительной биодоступности, максимальной концентрации и времени ее достижения, клиренса, периода полувыведения) — это концентрации вещества и/или его метаболита, измеренные в различных точках временного интервала, в той или иной биологической жидкости или ткани. Основным методом анализа при изучении фармакокинетики, обеспечивающим достаточную чувствительность и селективность при анализе сложных биологических матриц, в последние десятилетия является жидкостная хроматография — высокоэффективная (ВЭЖХ) или сверхвысокоэффективная (СЭЖХ), а в последние 10 – 15 лет — гибридный метод, сочетающий хроматографию и масс-спектрометрию [14].

Подготовка проб. Первым этапом анализа биологических проб является подготовка пробы. Основная биологическая матрица при изучении ФК *in vivo* в организме животных или человека — плазма крови, реже моча. В некоторых случаях необходимо определять содержание изучаемых веществ в тканях печени, почек, мозга, желудка и т.д. В исследованиях *in vitro* матрицей служит культуральная жидкость, содержащая клетки (гепатоциты, микросомы, клетки кишечного эпителия) или биомолекулы (белки, ДНК).

Существуют 3 основных способа подготовки биологической пробы перед вводом в хроматографическую систему: осаждение белков (ОБ), жидкост-

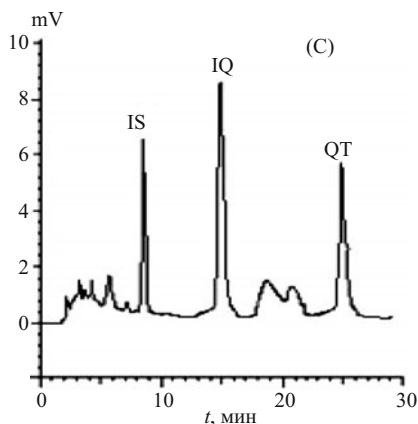


Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограмма плазмы крысы через 0,83 ч после перорального введения экстракта *Hypericum japonicum* (эквивалент 48 мг/кг кверцитрина). УФ-детектор, остальные условия — табл. 2 [20] (IQ — изокверцитрин, QT — кверцитрин, IS — внутренний стандарт).

но-жидкостная экстракция (ЖЖЭ), твердофазная экстракция (ТФЭ) [15]. Способ ОБ — денатурация под действием растворителя — универсален и прост. После внесения растворителя (метанола, ацетонитрила) жидкие пробы интенсивно перемешиваются на вортексе, центрифугируются, после чего супернатант или сразу вводится в прибор, или подвергается дополнительному концентрированию путем упаривания и повторного растворения в другом растворителе, близком по составу к элюенту в последующем анализе. В рутинных анализах ОБ в большинстве случаев дает удовлетворительные результаты, степень извлечения флавонолов составляет около 75 % (табл. 2) [16–19]. Вариант осаждения раствором неорганического вещества, использованный в работе [20] (хлорная кислота, степень извлечения 115 %), встречается крайне редко.

ЖЖЭ, основанная на распределении молекул между несмешивающимися жидкостями, проводится примерно по той же схеме. В качестве экстрагента при извлечении кверцетина и родственных соединений используют преимущественно этилацетат, который для стабилизации компонентов пробы подкисляют аскорбиновой, соляной или другими кислотами. Стадия упаривания этилацетата и растворения в растворителе, близком по составу к элюенту для хроматографирования, обязательна [21–25]. Экстракт, получаемый после ЖЖЭ, обычно чище, чем после ОБ, степень извлечения составляет около 70 %.

ТФЭ, основанная на адсорбции на твердом сорбенте в хроматографическом режиме, дает еще более чистый экстракт, однако она и более трудоемка, так как обычно включает несколько последовательных операций промывки сорбента водно-органическими растворителями: 1) кондиционирование, 2) нанесение пробы, 3) смыв мешающих компонентов “слабым” растворителем, 4) смыв целевых компонентов “сильным” растворителем, например метанолом. Чаще всего используют популярный сорбент типа С18, причем процесс может быть осуществлен как на заполненных сорбентом дешевых коротких колонках (картриджах), так и

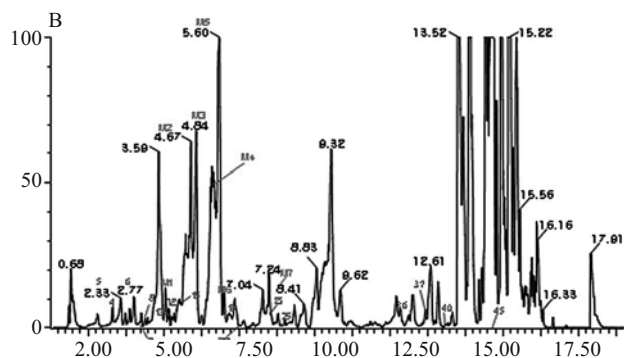


Рис. 4. Анализ сыворотки крысы через 45 мин после введения экстракта *Moutan Cortex* [26]. Условия — см. табл. 2.

на 96-луночных планшетах. В работе [26] при скрининге биоактивных компонентов растительного препарата *Mutan Cortex*, содержащего в том числе флавонолы, подготовка сыворотки крыс проводилась на картриджах типа Oasis HLB. Картриджи Sep-Pak C18 использовали при подготовке к анализу пробы мочи крыс после перорального введения экстракта клюквы, содержащего кверцетин, кемперол, гликозиды кверцетина и другие флавоноиды [19].

Часто ТФЭ используют как вторую, дополнительную, стадию очистки, например после первоначальной ультрафильтрации [27]. Три гликозида изофлавоноида определены в плазме крыс после перорального введения экстракта *Astragalus mongholicus* [28]. Первоначально осаждали белки плазмы метанолом, далее супернатант очищали на ТФЭ-картридже.

Наиболее сложные для подготовки матрицы — различные ткани. При подробном изучении метаболизма кверцетина проводили анализ не только плазмы, но и тканей печени и почек, тканей и содержимого желудка крысы [29]. После промывки ткани ЖКТ гомогенизировали в растворе 1:1 метанола и 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,0, с добавлением в качестве антиоксиданта диэтилдитиокарбамата до концентрации 20 мМ. Гомогенат экстрагировали 3 раза указанным раствором, после центрифугирования 3 супернатанта объединяли и упаривали под вакуумом. Оставшийся водный раствор экстрагировали этилацетатом, затем его очищали методом ТФЭ на картриджах C18 Sep с использованием метанола. Метанольную и этилацетатную фракции объединяли и упаривали до 500 мкл.

Возможности более селективного детектирования tandemными масс-спектрометрами (см. далее) снижают требования к подготовке пробы. Ткани мочевого пузыря крысы после замораживания в жидком азоте гомогенизировали и однократно экстрагировали водно-метанольной смесью (20:80) с 0,1 % уксусной кислотой [19]. Анализ супернатанта показал присутствие неконъюгированных кверцетина и изорамнетина после продолжительного приема клюквенного экстракта, тогда как в моче эти компоненты не наблюдались.

Хроматография. Хорошее хроматографическое разделение целевых компонентов — следующий необходимый этап в достижении конечной цели анализа

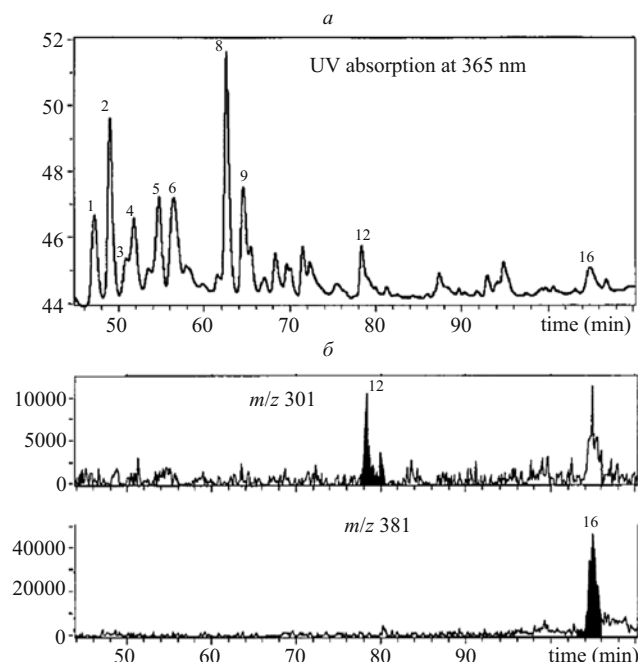


Рис. 5. Анализ ткани тонкого кишечника крысы, получавшей 58,5 мг/день кверцетина в течение недели: *a* — УФ-детектор, 365 нм, *б*, *в* — ионная ловушка, режим SIM для ионов 301 (кверцетин) и 381 (конъюгат сульфат кверцетина) [29]. Остальные условия см. в табл. 2.

[30]. В качестве сорбентов при аналитическом определении флавонолов и других полифенольных соединений используют преимущественно обращенную фазу типа С18. В табл. 2 приведены коммерческие названия сорбентов, которые были использованы в работах разных авторов; все они относятся к типу С18, хотя свойства их могут немного различаться. В некоторых случаях, в частности при определении метаболитов флавонолов, рекомендовано выбирать более полярные фазы. Так, в работе [31] разделяли смесь метаболитов 4 компонентов — кверцетина, рутина, изокверцитрина и таксифолина, полученную при инкубировании *in vitro* с 2 видами гепатоцитов человека и крысы, в виде клеточной суспензии или первичной культуры. На силикагеле с химической модификацией группами цианопропил или фенил были получены лучшие результаты, чем на сорбенте, модифицированном группами С8 или С18. Типичные условия для ВЭЖХ-анализа: колонки длиной от 50 до 250 мм и диаметром 2 или 4,6 мм, сорбент со стандартным размером зерна 5 или 3 мкм; элюент — водно-органический (метанол, ацетонитрил) с добавлением примерно 0,1 % муравьиной кислоты, если детектором служит масс-спектрометр, уксусной или фосфорной кислоты, если в качестве детектора используется диодная матрица (табл. 2). Если цель анализа — один-два известных компонента, то достаточно изократического (с постоянным составом растворителя) режима элюирования.

На рис. 2 и 3 приведены ВЭЖХ-хроматограммы соответственно плазмы человека и плазмы крысы; первая — после приема добровольцами зеленого чая, в котором содержится кверцетин; вторая — после введе-

ния перорально растительного лекарственного экстракта *Hypericum japonicum*, содержащего биофлавоноиды. Продолжительность анализов — 30–40 мин, в первом случае количественно определен один компонент, во втором — два (данные публикаций 2004 и 2008 гг.).

При анализе смеси веществ сильно различающейся полярности (растительных фармпрепаратов, пищевых продуктов) или при определении различных метаболитов используют градиентное элюирование с изменением содержания органической составляющей в широком интервале значений [27]. Продолжительность ВЭЖХ-анализа при этом может достигать 120 мин [29].

В последние годы происходит постепенное вытеснение методов ВЭЖХ следующим поколением хроматографических методов — СЭЖХ, которые осуществляются на колонках с более мелким размером частиц сорбента (1,7 мкм). Как следствие, повышается эффективность, чувствительность и экспрессность хроматографического анализа, но одновременно возрастает величина противодействия потоку элюента. По этой причине требуется система подачи растворителя (насосы) с повышенными рабочими давлениями, более 1000 атм (максимальное значение для ВЭЖХ — 400 атм).

Новые возможности СЭЖХ (в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием) находят свое применение в анализе пищевого и лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды, а также биожидкостей и тканей, содержащих компоненты этого сырья при поступлении его в организм. Так, с использованием разделительной способности систем СЭЖХ идентифицируют компоненты сложных смесей растительных лекарственных препаратов в биологических пробах, при этом продолжительность анализа сокращается в 3–5 раз и составляет 10–15 мин [19, 26, 32].

На рис. 4 показана СЭЖХ-хроматограмма с регистрацией масс-детектором типа QqTOF. Анализовали сыворотку крысы после введения животному перорально экстракта лекарственного растения *Moutan Cortex*. При продолжительности анализа 18 мин зарегистрировано 46 индивидуальных пиков, в том числе флавонолы кверцетин, кемпферол и др., из которых 16 идентифицированы как исходные компоненты сырья, содержащиеся в экстракте, и 7 — как их метаболиты.

Детектирование. Все агликоны флавоноидов хорошо поглощают излучение УФ-диапазона, поэтому применение детекторов типа спектрофотометра или диодной матрицы обеспечивает неплохую чувствительность. Долгое время это был самый распространенный вариант количественных измерений, он и сейчас нередко используется, если требования к анализу не слишком высоки: определение одного-двух компонентов, или нескольких при не слишком низких концентрациях. Например, взаимное влияние кверцетина и кемпферола на транспорт через клеточные мембраны *in vitro* рассмотрено в [17]; величина предела определения с помощью УФ-детектора 50 нг/мл удовлетво-

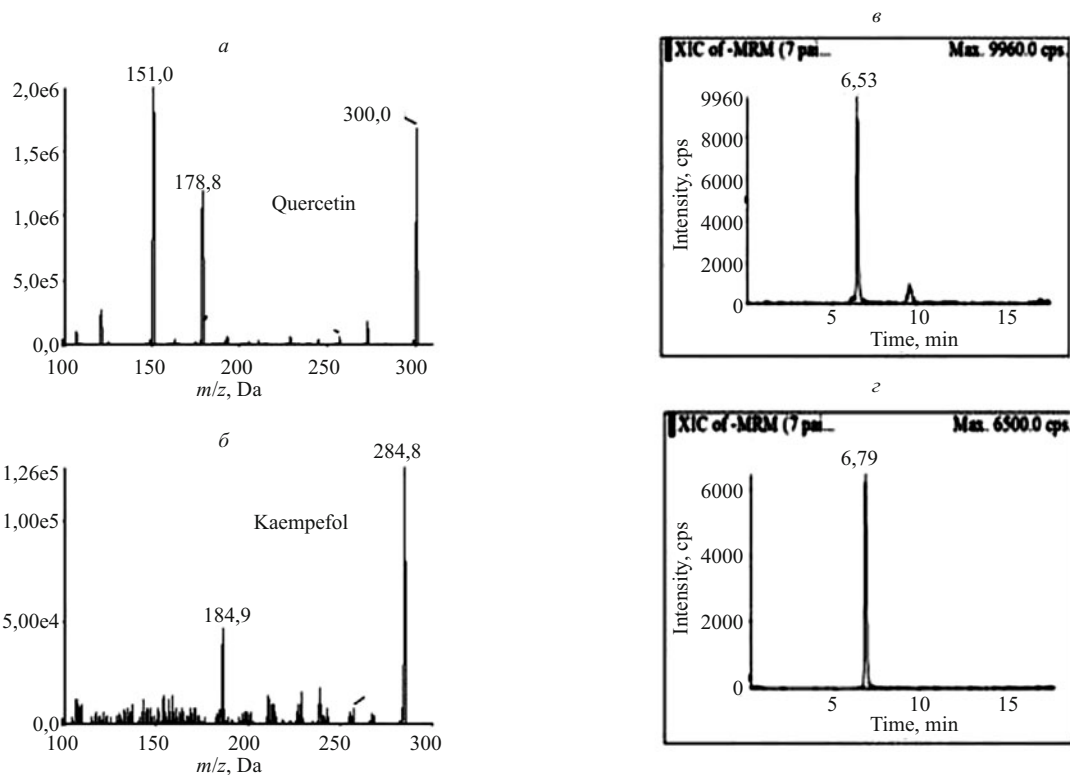


Рис. 6. MS/MS-спектры отрицательных ионов при фрагментации кверцетина (а) и кемпферола (б), энергии фрагментации 26,7 и 38 эВ соответственно. MRM-хроматограммы плазмы крысы через 45 мин после перорального введения экстракта *Oldenlandia diffusa*, кверцетина (в) и кемпферола (г), введен эквивалент 17,1 кверцетина и 2,4 мг/кг кемпферола [25].

ряла условиям задачи. Диодноматричный детектор использован при изучении *in vitro* проницаемости рогового слоя свиной кожи для кверцетина, рутина и других флавоноидов [35].

Нижний предел определения 1,5 пг (при соответствующем пересчете — 15 нг/мл пробы) был достигнут при электрохимическом детектировании, использующем окислительно-восстановительные свойства фенольных соединений [24]. Хроматограмма плазмы крови добровольцев, употреблявших зеленый чай, после ферментативного гидролиза глюкуронидов и сульфатов кверцетина, показана на рис. 2.

Однако чувствительность и селективность “обычных” способов детектирования часто оказывается недостаточной. Состав биологических проб непостоянен, некоторые компоненты могут мешать определению целевых веществ. Это особенно актуально для исследования биофлавоноидов, поскольку содержащее их сырье растительного происхождения содержит большое количество веществ разных химических классов [36, 37]. Часто при этом ставится задача определить низкие “терапевтические” концентрации сразу нескольких не основных, а минорных составляющих. Особенную трудность представляет идентификация метаболитов, концентрация которых меньше, чем исходных веществ.

Хроматомасс-спектрометрия предоставляет свой ресурс “двойной” селективности и специфичности для анализов такого типа. Молекулы вещества-аналита, выходящие в потоке растворителя из хроматографиче-

ской колонки, ионизируются в устройстве-интерфейсе; образующиеся ионы направляются в работающий при высоком вакууме анализатор масс [30]. Флавоноиды обычно хорошо ионизируются с образованием отрицательных молекулярных ионов $[M-H]^-$, и только для некоторых производных используют регистрацию положительных ионов $[M+H]^+$ [20, 33].

Наиболее часто используемый интерфейс, отличающийся высокой стабильностью и эффективностью, — электрораспыление. Влияние состава подвижной фазы, а именно содержания в ней муравьиной кислоты, на эффективность образования отрицательных ионов при электрораспылении изучалось на примере кверцетина и кемпферола [21]. Было установлено, что при концентрации кислоты 0,001 %, т.е. на два порядка ниже обычных значений 0,1 %, чувствительность детектирования компонентов (тройной квадруполь в режиме MRM), напрямую связанная с их ионизируемостью, повышалась в несколько раз. В другой работе [38] сравнивали условия ионизации в источниках разных производителей оборудования. Кроме концентрации муравьиной кислоты, выявлено влияние аппаратных условий на чувствительность определения флавонолов и лактонов в плазме крови. Показано, что вносимая для стабилизации пробы аскорбиновая кислота оказывает мешающее влияние.

После источника ионы поступают в масс-анализатор, где происходит их разделение по шкале m/z , где m — масса иона, z — его заряд. Из существующих типов анализаторов наиболее важны для анализа биологиче-

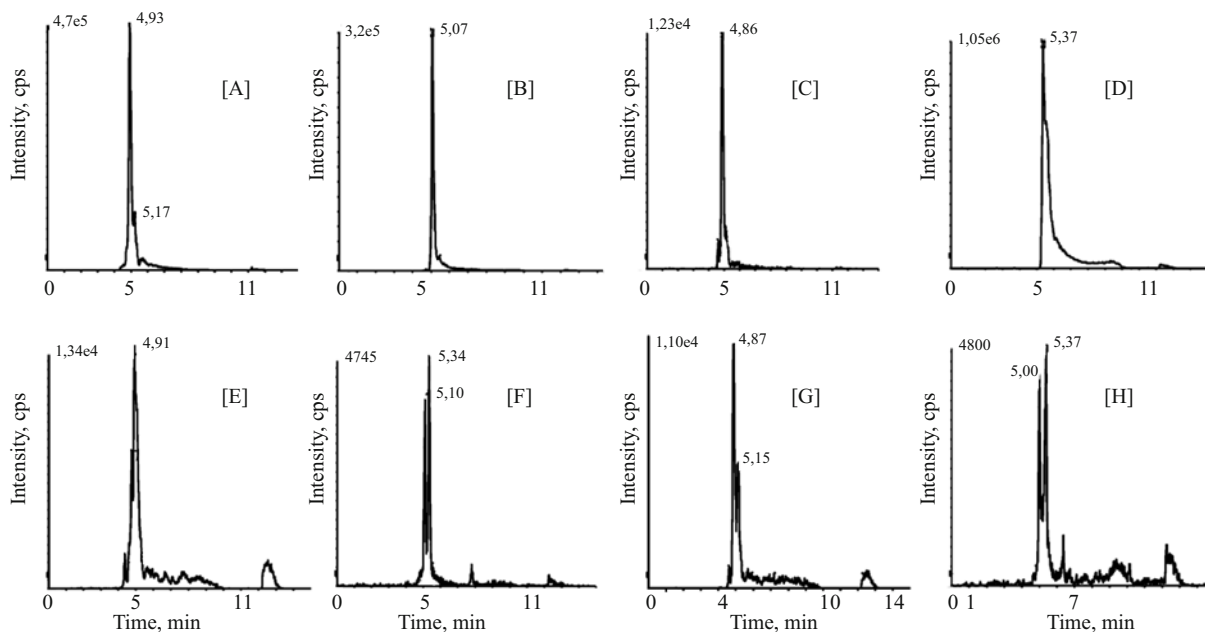


Рис. 7. MRM-хроматограммы глюкуронидов кверцетина и изорамнетина: А-Д — синтезированные стандарты, Е-Н — обнаруженные в моче крыс после приема концентрата клюквы. Используются переходы m/z : 477 > 301 (А, Е — моноглюкуронид кверцетина), 653 > 301 (В, F — диглюкуронид кверцетина), 491 > 315 (С, G — моноглюкуронид изорамнетина) и m/z 667 > 491 (D, Н — диглюкуронид изорамнетина) [19].

ских проб квадрупольный (Q), времяпролетный (TOF) и ионная ловушка (IT) [30]. Анализатор может регистрировать все поступающие ионы (сканирование) или только одиночные (режим выбранных ионов – SIM, selective ion monitoring), при котором выбранные ионы детектируются с большей чувствительностью, чем при сканировании.

На рис. 5 представлены хроматограммы, полученные при анализе ткани тонкого кишечника крысы с помощью диодноматричного детектора и ионной ловушки в режиме SIM отрицательных молекулярных ионов (М-Н)⁻ кверцетина (301 Да) и его сульфата (381 Да). Масс-спектрометрическое детектирование позволило идентифицировать пики и повысить селективность определения, хотя повышение чувствительности не столь значительно.

Развитием масс-спектрометрического метода стало появление тандемных масс-спектрометров (МС/МС). Они содержат не один, а два последовательно соединенных масс-анализатора, между которыми находится камера фрагментации ионов. Наиболее важны для ана-

лиза биологических проб тройной квадруполь (2 квадруполь и камера соударений, QqQ), квадруполь с ионной ловушкой (QqIT), квадруполь и времяпролетный анализатор (QqTOF). Разделение ионов происходит в обоих анализаторах, что позволяет осуществлять специальные режимы регистрации, в том числе режим сканирования ионов-фрагментов; его используют для идентификации и определения структуры ионов.

Режим так называемого мониторинга множественных реакций (MRM, multiple reaction monitoring), реализуемый в МС/МС типа тройного квадруполь, — это регистрация выбранных во втором анализаторе ионов-фрагментов, образовавшихся от заданных (в первом анализаторе) “родительских” молекулярных ионов. В этих условиях реализуется двойная селективность — по “родительскому” иону и по его “дочернему” фрагменту, что позволяет в рутинных анализах получать нижний предел определения 1 нг/мл и ниже с выполнением требований по воспроизводимости и точности анализа. Анализ в режиме MRM на протяжении последних 20 лет был и до сих пор остается “золотым стандартом” количественных анализов биологических проб.

Биофлавонолы и их гликозиды Таблица 1

Агликоны	Гликозиды
Кверцетин	Гиперозид, кверцитрин, изокверцитрин, рутин, спиреозид, троксерутин
Кемпферол	Астрагалин, кемпферитрин, робинин, амуренсин
Кемпферид	Икариин
Мирицетин	Мирицитрин
Рамнетин	Ксанторамнин
Азалеатин	Азалеин

Количественный анализ методом ЖХ-МС/МС

Примеры использования режимов MRM для количественных определений при изучении индивидуальных веществ-флавонолов многочисленны и разнообразны. Это, например, анализ культуральных жидкостей в исследованиях *in vitro* транспорта флавонолов через клеточные мембраны (взаимное влияние компонентов [17]), анализ плазмы животных и человека соответственно в доклинических и клинических исследованиях ФК, в том числе при разных путях поступле-

Методы определения флавонолов при изучении фармакокинетики и метаболизма

Цель анализа/субстанция, сырье/путь поступления	Матрица/способ извлечения	Определяемые компоненты	Аналитическая система/детектирование/диапазон измерения	Сорбент, фракция/размер колонки/подвижная фаза	Ссылка/год
ФК/зеленый чай/пищевое	Плазма человека/Гидролиз, EtOAc + АК	Кверцетин	ПолумикроВЭЖХ/электрохимич./1,5 – 750 пг или 15 – 7500 нг/мл	Carcell Pak C18, 3 мкм/150 × 1,0 мм/MeOH-0,5 % ФсК, 4:6	[24]/2004
Метаболизм, ФК/ИВ/перорально	Ткани и плазма крысы/(см. текст)	Кверцетин и 17 его метаболитов	ВЭЖХ-УФ (365 нм) – ИТ ⁻	Synergy RP-Max, 4 мкм/250 × 4,6 мм/MeOH-1 % МК, Градиент 5 – 40 % MeOH	[29]/2006
ФК/ИВ/перорально	Плазма человека/6 % HClO ₄ в воде	Троксерутин	ВЭЖХ-QqQ+/MRM 743,2 > 435,0/0,03 – 4 нг/мл	Synergi Fusion RP, 4 мкм/100 × 2 мм/MeCN-0,01 % МК, 20:80	[20]/2006
ФК/капсулы Ginkgo biloba/перорально	Плазма собаки/EtOAc + HCl, MeCN	Кверцетин Кемпферол	ВЭЖХ-QqQ ⁻ /MRM 301 > 151, 285 > 187/НПО 1,3 пг	Gemini C18, 5 мкм/50 × 2,0 мм/MeCN-0,001 % МК (A) (5:495, pH 3,78) MeCN-0,001 % МК (B) (450:50 pH 3,83) градиент 30 – 70 % B	[21]/2007
ФК/экстракт Nuregicum japonicum/перорально	Плазма крысы/EtOAc — изопропанол (95:5)	Кверцитрин Изокверцитрин	ВЭЖХ-УФ/350 нм/50 – 5000 нг/мл	Luna C18, 5 мкм/250 × 4,6 мм/MeCN-0,5 % УК, 17:83	[22]/2007
Константы связывания/Lonicera japonica/in vitro	Раствор ДНК/ультрафильтрация + ТФЭ C18	Кверцетин-3-О-гликозид Рутин Лютеолин-7-О-гликозид	ВЭЖХ-МС ^{+/-}	Zorbax Extend C18, 5 мкм/250 × 4,6 мм/0,4 % УК — MeCN, градиент 10,5 – 100 % MeCN	[27]/2008
Метаболизм/ИВ, лук/внутрижелудочно и пищевое	Плазма крысы и человека/MeOH	Кверцетин	ВЭЖХ-УФ/370 нм и ИТ (идентификация)	TSK gel ODS/150 × 4,6 мм/MeCN-0,5 % ФК, Градиент 15 – 40 % MeCN	[16]/2009
Транспорт Сасо2/ИВ и экстракт зверобоя/in vitro	Раствор Хенкса	Рутин “Гиперозид” Изокверцитрин, Кемферол-рутинозид	СЭЖХ-QqQ ⁻ /MRM 609,0 > 300,8, E = 49 эВ 463,3 > 300,8, E = 33 эВ 463,3 > 300,3, E = 35 эВ 267,1 > 252,1 E = 49 эВ	Diamondsil C18, 1,7 мкм/50 × 2,1 мм/MeCN-0,1 % МК Градиент 10 – 90 % MeCN	[32]/2010
Транспорт/ИВ/in vitro	Лизат гепатоцитов/MeOH	Кверцетин Кемпферол	ВЭЖХ-QqQ ⁻ /MRM E = 30 эВ 1 – 500 нг/мл	XTerra MS C18, 3,5 мкм/150 × 2,1 мм/MeCN-0,1 % МК, 50:50	[17]/2011
Метаболизм/концентрат клюквы/in vitro и внутрижелудочно	Плазма крысы/MeOH + УК, Моча/ТФЭ C18	Кверцетин, Изорамнетин, кемпферол, Мирицетин, Всего 7 флавоноидов и 13 метаболитов	СЭЖХ-QqQ ⁻ /MRM 301 > 151 315 > 151 285 > 185 317 > 179	Fusion C18, 1,8 мкм/150 × 2,1 мм/(0,1 % МК в MeCN) — 0,1 % МК Градиент 5 – 100 % MeCN	[19]/2011
ФК/экстракт Oldenlandia diffusa/перорально	Плазма крысы/EtOAc, MeOH	Кверцетин, Кемпферол и 3 феноловые кислоты	СЭЖХ-QqQ ⁻ /MRM 300,9/151,0, E = 27 эВ 284,8 > 184,9, E = 38 эВ 0,5 – 50 нг/мл	Gemini C18, 5 мкм/50 × 2,0 мм/0,01 % МК-MeOH-MeCN Градиент 82:8:10 – 5:5:90	[25]/2012
ФК, метаболизм/ИВ (синтез)/in vitro и внутрижелудочно	Ткани и плазма мышца гепатоциты	3',4',5'-триметокси-флавонол, метаболиты	ВЭЖХ-QqQ ⁺ /MRM	Gemini C18, 3 мкм/150 × 4,6 мм/100 мМ NH ₄ Ac-MeOH, 31:69, pH = 5,1	[33]/2012
Метаболизм/ИВ/in vitro	Буфер, кишечные бактерии/EtOAc, MeOH	Изокверцитрин, 2 метаболита	СЭЖХ-QqTOF ⁻	Synchronis C18, 1,7 мкм/100 × 2,1 мм/0,1 % МК — (0,1 % МК в MeCN) Градиент 10 – 90 % MeCN	[34]/2012
Транспорт через роговой слой/ИВ	Кожа свиньи/MeOH + 0,2 г/л АК в воде	Кверцетин, Рутин, Всего 6 флавоноидов	ВЭЖХ-УФ/254 нм/0,35 мкг/мл, 0,2 мкг/мл	Synergi 4U Hydro RP, 4 мкм/150 × 4,6 мм/2 % УК — (0,5 % УК в MeCN) Градиент 5 – 100 % MeCN	[35]/2013
ФК/ИВ/перорально, внутривенно	Плазма крысы/MeOH	Кверцетин-3-О-β-D-гликопиранозид(4 → 1)-α-L-рамнозид	СЭЖХ-QqQ ⁻ /MRM 609,351 > 300,077/1,5 – 74 нг/мл	Acquity BEH C18, 1,7 мкм/100 × 2,1 мм/MeCN — 0,1 % МК Градиент 20 – 30 % MeCN	[18]/2013
Идентификация и метаболизм/экстракт Mutan Cortex/ перорально	Сыворотка крысы/ФсК/ТФЭ Oasis HLB	Кверцетин, Кемпферол, Изорамнетин, всего 23 компонента	СЭЖХ-QqTOF ⁻	AcquityHSS T3, 1,7 мкм/100 × 2,1 мм/0,1 % МК — (0,1 % МК в MeCN) Градиент 1 – 100 % MeCN	[63]/2013

Примечания. ФК — фармакокинетика; ИВ — индивидуальное вещество, ⁻⁽⁺⁾ — регистрация отрицательных (положительных) ионов, E — энергия фрагментации в режиме MRM, эВ, EtOAc — этилацетат, MeCN — ацетонитрил, MeOH — метанол, NH₄Ac — ацетат аммония, МК — муравьиная кислота, УК — уксусная кислота, АК — аскорбиновая кислота, ФсК — фосфорная кислота (процент кислоты относится к водному раствору, если не указано иначе), НПО — нижний предел определения.

ния вещества в организм [18, 20], а также новых синтетических флавонолов [33].

Однако наибольшее количество анализов в последние годы выполняется в связи с изучением биодоступности и других ФК-параметров биологически активных флавонолов при их поступлении с продуктами питания и растительными лекарственными препаратами, такими как средства традиционной китайской медицины. Разработаны методы одновременных количественных определений в биожидкостях многих компонентов, входящих в растительное сырье, и среди них флавонолов-агликонов — кверцетина, кемпферола, и гликозидов — рутина, кверцитрина и других. Так, концентрации кверцетина, кемпферола определялись в плазме собаки после перорального приема капсул Tian-Bao-Ning (на основе Гинкго билоба) [21], кверцетина после приема гранул Feng-Liao-Chang-Wei-Kang [39], кверцетина, кемпферола, рутина, изокверцитрина, изорамнетина и астрагалина после перорального приема экстракта листьев малины [37], кверцетина, кемпферола, рутина и других компонентов после приема экстракта плодов софоры японской (*Fructus Sophorae*) [40].

В работе [25] представлен метод количественного определения в плазме крысы 2 флавонолов — кверцетина, кемпферола и 3 феноловых кислот — олеаноловой, *n*-кумаровой и ферруловой. Метод был применен для изучения ФК веществ после приема перорально экстракта гедиотиса (*Oldenlandia diffusa*). На рис. 6, а, б показаны масс-спектры фрагментации отрицательных молекулярных ионов (М-Н)⁻ кверцетина и кемпферола, а на рис. 6, в, г — MRM-хроматограммы плазмы крысы через 45 мин после перорального введения экстракта. Для количественного определения выбраны MRM-переходы 300,9 > 151,0 и 284,8 > 184,9. При этом режиме регистрации мешающее влияние других

компонентов пробы минимально, нижний предел определения в плазме составил 0,5 нг/мл.

Все методы количественного анализа, используемые для ФК-исследований, проходят полную валидацию: кроме построения градуировочной зависимости в требуемом диапазоне концентраций, определяется специфичность, стабильность пробы, воспроизводимость, точность (не хуже 15 %), степень извлечения при подготовке пробы [20, 25, 37, 40]. Особое внимание уделяется подтверждению отсутствия матричного эффекта (влияния на результаты анализа фоновых эндогенных компонентов) и выбору внутреннего стандарта (вещества, близкого по структуре к анализируемому или того же, но меченного каким-либо стабильным изотопом), необходимого для проведения количественных измерений.

Идентификация исходных компонентов растительного сырья и их метаболитов в биологических пробах

Возможности идентификации веществ на основании данных УФ-детектирования и одностадийных масс-спектрометров достаточно ограничены, для надежной идентификации и установления структуры привлекаются данные ЯМР-спектроскопии, как, например, при идентификации 14 моно- и диконъюгатов кверцетина 2-й фазы метаболизма в исследованиях *in vitro* [41].

В одной из первых работ (2002 г.), где метод ЖХ-МС был использован для установления метаболитов флавонолов, изучали метаболизм кверцетина и кемпферола на культуре гепатоцитов крысы [42]. Показано, что после инкубации оба вещества почти полностью метаболизировали, при этом было обнаружено 4 глюкуронида кверцетина и 2 глюкуронида кемпферола. Установлено, что при инкубации с гепатоцитами образуются те же соединения, что и при инкубации с

Таблица 3

ФК-параметры некоторых компонентов обогащенного экстракта *Hibiscus sabdariffa* и их метаболитов [44]

Исходные соединения и метаболиты (м)	Введенная доза, мкМ ¹	Максимальное содержание в плазме ² , нМ	C _{max} , мкМ	t _{max} , мин	t _{1/2} , мин
Кверцетин	6,9	24,4	1,57	60	81,5
Производные кверцетина	16,8				
Производные кемпферола	2,0				
Кверцетин диглюкуронид 1 (м)		11,1	0,71 ³	> 120	— ⁴
Кверцетин диглюкуронид 2 (м)		3,6	0,23 ³	> 120	— ⁴
Кверцетин диглюкуронид 3 (м)		14,4	0,92	60	70,7
Кверцетин диглюкуронид 4 (м)		11,4	0,73	60	433,2
Кверцетин глюкуронид 1 (м)		33,9	2,17 ³	> 120	— ⁴
Кверцетин глюкуронид 2 (м)		12,4	0,79	20	80,6
Метилкверцетин (м)		13,7	0,88 ³	> 120	— ⁴
Кемпферол (м)		12,7	0,81	> 120	— ⁴
Кемпферол глюкуронид 1 (м)		4,2	0,27	60	43,3
Кемпферол глюкуронид 2 (м)		11,4	0,73	> 120	— ⁴

¹ Введенное количество рассчитано на основании предварительного определения концентрации вещества во введенном экстракте; ² рассчитано при t_{max}, исходя из среднего содержания плазмы 60 мкг/кг (6 % массы тела); ³ t_{max} не определено, так как не достигнута C_{max}; ⁴ t_{1/2} не определено, так как кривая не имела спада.

ферментом глюкуронилтрансферазой UGT1A9. Также проанализированы образцы плазмы добровольцев после назначения им капсул Гинко Билоба — растения, богатого гликозидами флавонолов. В плазме были обнаружены гликозиды, а не глюкурониды кверцетина и кемпферола, т.е. подтвердилось, что имеет место абсорбция неизмененных гликозидов флавонолов без их расщепления до агликонов.

Установление путей метаболических превращений индивидуального флавонола осуществляют не только при проведении исследований на моделях *in vitro* — на гепатоцитах животных и человека [33, 41, 42], в бактериальной среде [34], но и *in vivo* с участием экспериментальных животных [16, 19] и человека [16, 43]. В экспериментах с участием животных анализируется не только плазма и моча, но и внутренние ткани ЖКТ, печени, почек и др. [29].

В работе [16] проведено сравнение метаболизма кверцетина в организме крыс при разных путях поступления: внутрижелудочно и с пищей. В результате ВЭЖХ-УФ-анализа обнаружено большее разнообразие метаболитов при внутрижелудочном введении кверцетина, чем при пищевом приеме. Последующий масс-спектрометрический анализ выделенных фракций на масс-спектрометре типа ионной ловушки позволил идентифицировать 3 метаболита по спектрам фрагментации MS² и MS³: метилкверцетинсульфоглюкуронид, кверцетинсульфоглюкуронид и метилкверцетинсульфат.

По мере накопления данных о метаболизме при исследовании индивидуальных веществ внимание исследователей все больше переключается на более сложные задачи изучения многокомпонентного растительного сырья [26, 44]. Как правило, на начальном этапе решается задача установления состава вводимой в организм смеси, например экстракта лекарственного растения, и только потом идентификация установленных исходных компонентов и образовавшихся метаболитов в плазме или другой матрице организма. Идентификация и установление структуры флавоноидов, вообще говоря, — это отдельная задача, на решение которой направлены значительные усилия [13, 45].

Метаболиты полифенолов, содержащихся в клюкве, определяли при анализе плазмы крыс на масс-спектрометре типа тройной квадруполь [19]. Для идентификации метаболитов вначале были получены данные режима MRM синтезированных стандартов предполагаемых метаболитов (установлены характеристические пары “родительский” — “дочерний” ионы и оптимизированы условия анализа). Затем в тех же условиях проанализированы экспериментальные пробы (рис. 7). В моче животных обнаружены кверцетин, 3'-О-метилкверцетин (изорамнетин), мирицетин, кемпферол и 13 конъюгатов кверцетина и метилкверцетина с глюкуроновой кислотой. Кверцетин в плазме не обнаружили, зато при многократном приеме клюквенного экстракта кверцетин и изорамнетин нашли в метанольном экстракте ткани мочевого пузыря. Это позволило предположить возможность использования

указанного сырья для ингибирования канцерогенеза в мочевом пузыре.

Предыдущий пример показывает, что идентификация соединений масс-спектрометрами низкого разрешения, к которым относится тройной квадруполь, возможна, но проведение исследования продолжительно и трудоемко, так как связано с необходимостью встречного синтеза предполагаемых метаболитов и установления параметров регистрации каждого компонента. Кроме того, имеются сведения, что при этом возможно получение ложноположительных результатов [46].

Значительно расширяет возможности идентификации использование тандемных масс-спектрометров высокого разрешения (МСВР) типа QqTOF, имеющих в качестве второй ступени времяпролетный анализатор. (Высоким считается разрешение, когда отношение массы иона к ширине его спектральной линии на полувысоте больше 10000.) В МСВР масса может быть измерена с точностью до четвертого-пятого знака после запятой, что позволяет определять с высокой достоверностью элементный состав иона. Таким образом в одном анализе по точной массе молекулярного иона и его фрагментов можно делать предположения о структуре неизвестных метаболитов; исследование метаболизма становится рутинной задачей.

Для изучения метаболизма нескольких флавонолов, включая кверцетин, рутин, изокверцитрин и таксифолин, был разработан метод, использующий МСВР типа QqTOF. Исследования проводили *in vitro* на модели гепатоцитов человека и крысы, представленных как в виде первичных культур, так и в виде суспензии [29]. Соединения-метаболиты 1-й и 2-й фазы идентифицированы на основании данных об элементном составе; кроме того, были привлечены данные о фрагментации и спектры УФ-поглощения. Показано, что преимущественно образовывались метилированные флавонолы и их глюкурониды, причем кверцетин и таксифолин подвержены большей трансформации, чем гликозиды рутина и изокверцитрина.

Идентификации активных компонентов, ответственных за терапевтическое действие лекарственного растения суданской розы (*Hibiscus sabdariffa*), с использованием МСВР была проведена в [44]. Предварительно был изучен состав обогащенного водного экстракта растения и на этой основе рассчитано количество того или иного компонента (кверцетин) или группы веществ (производные кверцетина и кемпферола), вводимого экспериментальным крысам. Компоненты, присутствующие в плазме крыс после внутрижелудочного введения, были охарактеризованы и количественно определены. Обнаружено 17 полифенолов (феноловые кислоты и флавонолы), 11 из них — метаболиты, в том числе глюкурониды кемпферола и кверцетина (табл. 3). Время полувыведения глюкуронидов флавонолов оказалось больше, чем кислот. Также был измерен антиоксидантный статус плазмы после приема экстракта и высказано предположение, что именно флавонолы ответственны за ингибирование

ПОЛ в клеточных мембранах и антиоксидантное действие растительного экстракта.

Идентификация метаболитов изокверцитрина (3-D-глюкозидкверцетина), образовавшихся при инкубировании в присутствии смеси кишечных бактерий человека, осуществлена при использовании системы СЭЖХ-QqTOF [32]. После извлечения этилацетатом смесь анализировали в режиме градиентного элюирования (0,1 % муравьиной кислоты — ацетонитрил, концентрация ацетонитрила менялась от 10 до 90 %, цикл анализа 10 мин). Обнаружено 5 метаболитов и исходное соединение. На основании точно измеренной массы и структуры исходного вещества предложены пути метаболизма: гидролиз (с образованием кверцетина), ацетилирование и дегидроксилирование кверцитрина (гликозида кверцетина), гидрокселирование и гидроксиметилирование кверцетина.

Экстракт корня пиона кустарникового (*Paeonia suffruticosa Andrews*), известного как препарат традиционной китайской медицины Moutan Cortex, был объектом изучения в работе [23]. Для скрининга содержащихся в сыворотке крыс компонентов после перорального приема экстракта был разработан высокопроизводительный метод. Система анализа включала быстрый автоматизированный хроматографический метод СЭЖХ, высокоточное определение массы отрицательных ионов-фрагментов в масс-спектрометре высокого разрешения (QqTOF) и средства компьютерной обработки данных MetaboLynx™. При анализе экстракта растения был охарактеризован 41 пик из 46 зарегистрированных (см. рис. 4), среди них флавонолы и другие полифенольные соединения. В сыворотке идентифицировано 23 пика, из них 16 — исходные компоненты сырья и 7 — метаболиты. Авторы надеются, что предложенный простой и чувствительный метод скрининга и идентификации биоактивных компонентов может быть использован для разработки новых лекарственных средств на основе любого сложно-растительного лекарственного сырья.

Таким образом, гибридный вариант жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии стал преобладающим рутинным методом анализа биологических проб. При этом по мере накопления данных о фармакокинетике и метаболизме индивидуальных веществ все большее внимание уделяется изучению процессов, связанных с поступлением в организм многокомпонентного растительного сырья, содержащего соединения этого класса наряду с другими биологически активными веществами. В соответствии с общей тенденцией повышения чувствительности и селективности анализа происходит совершенствование методов за счет использования СЭЖХ и тандемных масс-спектрометров высокого разрешения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Б. Меньщикова, В. З., Ланкин, Н. К. Зенков и др., *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*, Фирма «Слово», Москва (2006).

2. В. Ю. Богачев, О. В. Голованова, А. Н. Кузнецов, А. О. Шекоян, *Ангиология и сосудистая хир.*, **19**(1), 1 – 8 (2013).
3. Е. Ю. Бахтенко, П. Б. Курапов, *Многообразие вторичных метаболитов высших растений*, Изд-во ВГПУ, Вологда (2008).
4. *Химическая энциклопедия*, Т. 5, БСЭ, Москва (1998). с. 104.
5. <http://en.wikipedia.org/wiki/Flavonols>.
6. M. Materska, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **58**(4), 407 – 413 (2008).
7. J. Cao, Y. Zhang, W. Chen, X. Zhao, *Br. J. Nutr.*, **103**(2), 249 – 255 (2010).
8. S. Kumar, A. K. Pandey, *Scientific World J.*, **2013**, 162750 (2013).
9. Г. Пуоджюне, В. Кайрите, В. Янулис и др., *Хим-фарм. журн.*, **45**(2), 26 – 28 (2011); *Pharm. Chem. J.*, **45**(2), 88 – 90 (2011).
10. А. З. Абышев, Э. М. Агаев, А. Б. Гусейнов, *Хим-фарм. журн.*, **41**(8), 23 – 26 (2007); *Pharm. Chem. J.*, **41**(8), 419 – 423 (2007).
11. H. El Hajji, E. Nkhili, V. Tomao, O. Dangles, *Free Radic. Res.*, **40**(3), 303 – 320 (2006).
12. G. S. Kelly, *Altern. Med. Rev.*, **16**(2), 172 – 194 (2011).
13. E. H. Liu, L. W. Qi, J. Cao, et al., *Molecules*, **13**(10), 2521 – 2544 (2008).
14. J. K. Prasain, S. Barnes, *Mol. Pharm.* **4**(6), 846 – 864 (2007).
15. P. L. Kole, G. Venkatesh, J. Kotecha, R. Sheshala, *Biomed. Chromatogr.*, **25**(1 – 2), 199 – 217 (2011).
16. Y. Kawai, S. Saito, T. Nishikawa, et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**(3), 517 – 523 (2009).
17. G. An, J. Gallegos, M. E. Morris, *Drug Metab Dispos.*, **39**(3), 426 – 432 (2011).
18. X. Yao, G. Zhou, Y. Tang, et al., *Molecules*, **18**, 3050 – 3059 (2013).
19. R. Rajbhandari, N. Peng, R. Moore, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **59**(12), 6682 – 6688 (2011).
20. F. Liu, Y. Xu, L. Rui, et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**(23), 3522 – 3526 (2006).
21. Y. Zhao, L. Wang, Y. Bao, C. Li, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**(6), 971 – 981 (2007).
22. Li J., Wang Z.-W., L. Zhang, X., et al., *Biomed. Chromatogr.*, **22**(4), 374 – 378 (2008).
23. Li N., Liu C., Mi S., et al., *J. Chromatogr. Sci.*, **50**(10), 885 – 892 (2012).
24. D. Jin, H. Hakamata, K. Takahashi, et al., *Biomed. Chromatogr.*, **18**(9), 662 – 666 (2004).
25. N. Li, C. Liu, S. Mi, *J. Chromatogr. Sci.*, **50**(10), 885 – 892 (2012).
26. J. Liu, H., Sun, A. Zhang, et al., *Biomed. Chromatogr.*, **28**(4), 500 – 510 (2014).
27. J. L. Zhou, Z. M. Qian, Y. D. Luo, *Biomed. Chromatogr.*, **22**(10), 1164 – 1172 (2008).
28. X. Zhang, Y. G. Sun, M. C. Cheng, et al., *Anal. Chim. Acta*, **602**(2), 252 – 258 (2007).
29. B. A. Graf, C. Ameho, G. G. Dolnikowski, *J. Nutr.*, **136**(1), 39 – 44 (2006).
30. J.-S. Kang, in: *Tandem Mass Spectrometry — Applications and Principles*, Jeevan Prasain (Ed.). [Electronic resource] INTECH [Official website] URL: <http://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-applications-and-principles> (accessed: 12.07.2013).
31. J. Vacek, B. Papoušková, P. Kosina, et al., *J. Chromatogr. B. Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **899**, 109 – 115 (2012).
32. S. Gao, W. Jiang, T. Yin, and M. Hu, *J. Agric. Food Chem.*, **58**(11), 6650 – 6659 (2010).
33. S. E. Saad, D. J. Jones, L. M. Norris, et al., *Biomed. Chromatogr.*, **26**(12), 1559 – 1566 (2012).
34. Lu L., Qian D., Yang J., Jiang S., et al., *Biomed. Chromatogr.*, **27**(4), 509 – 514 (2013).
35. O. V. Zillich, U. Schweiggert-Weisz, K. Hasenkopf, et al., *Biomed. Chromatogr.*, **27**(11), 1444 – 1451 (2013).
36. M. J. Gray, D. Chang, Y. Zhang, et al., *Biomed. Chromatogr.*, **24**(1), 91 – 103 (2010).

37. J. He, Y. Feng, H. Z. Ouyang, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **84**, 189 – 195 (2013).
38. W. Niu, X. Zhu, K. Yu, et al., *J. Mass Spectrom.*, **47**(3), 370 – 380 (2012).
39. J. Zhang, X. Liu, N. Fu, et al., *J. Ethnopharmacol.*, **133**(2), 911 – 913 (2011).
40. L. Chang, Y. Ren, L. Cao, et al., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **904**, 59 – 64 (2012).
41. H. van der Woude, M. G. Boersma, J. Vervoort, I. M. Rietjens, *Chem. Res. Toxicol.*, **17**(11), 1520 – 1530 (2004).
42. E. J. Oliveira, D. G. Watson, M. H. Grant, *Xenobiotica.*, **32**(4), 279 – 287 (2002).
43. L. Wang, M. E. Morris, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **821**(2), 194 – 201 (2005).
44. S. Fernández-Arroyo, M. Herranz-López, R. Beltrán-Debón, *Mol. Nutr. Food Res.*, **56**(10), 1590 – 1595 (2012).
45. R. March, J. Brodbelt, *J. Mass Spectrom.*, **43**(12), 1581 – 1617 (2008).
46. T. Rousu, J. Herttuainen, A. Tolonen, *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **24**(7), 939 – 957 (2010).

Поступила 16.04.14

PHARMACOKINETICS OF QUERCETIN AND OTHER FLAVONOLS STUDIED BY LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY METHODS (A REVIEW)

E. B. Guglya

Institute for Fundamental and Applied Biomedical Research, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

The review summarizes application of liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS/MS) methods to studying pharmacokinetics of quercetin and other flavonols – biologically active substances possessing various therapeutic properties. Possible variants of preparing biological fluids and tissues for the analysis, chromatography conditions, and mass-spectrometric detection are considered for various flavonols in the form of aglycones, glycosides, and their metabolites. Typical examples of the quantitative determination of flavonols in biological samples and their mass-spectrometric identification *in vitro* and *in vivo* during testing of both individual substances and multicomponent plant extracts are considered.

Keywords: quercetin; flavonols; flavonoids; pharmacokinetics; bioanalysis; LC-MS/MS



Пресс-релиз
14.08.2014

Первые 2,5 млн. доз вакцины против гриппа производства НПО «Микроген» отгружены в российские регионы

Общий объем поставок компании по Национальному календарю профилактических прививок на текущий год составляет более 18,5 млн. доз. Отгрузки уже начались в Приволжский, Сибирский, Уральский, Дальневосточный, Южный и Центральный федеральные округа, а также в Москву и Московскую область.

Благодаря уникальной для России «холодовой цепи» НПО «Микроген», автопарк которой был обновлен этим летом, уже в сентябре компания поставит в регионы более 10 млн. доз вакцины «Гриппол».

Напомним, что НПО «Микроген» более десяти лет остается крупнейшим производителем вакцин для Национального календаря профилактических прививок. В 2013 году компания обеспечила более 70% потребностей страны в вакцинах.

Пресс-служба НПО «Микроген»

О НПО «Микроген»

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России образовано в мае 2003 года путем слияния унитарных государственных предприятий, производящих иммунобиологические препараты.

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России является крупнейшим производителем иммунобиологических препаратов в стране, в том числе вакцин, сывороток, специфических иммуноглобулинов, питательных сред, аллергенов, пробиотиков. Особым уникальным направлением научно-производственной деятельности предприятия является производство бактериофагов.

В «портфеле» предприятия значатся 62 препарата, входящих в перечень ЖНВЛП, и 121 наименование иммунобиологических препаратов, в том числе 13 вакцин Национального календаря профилактических прививок и 10 вакцин против социально-значимых инфекционных заболеваний.

История филиалов Предприятия: «Пермское НПО «Биомед» г. Пермь, «Иммунопрепарат» г. Уфа и «НПО «Вирион» г. Томск насчитывает более 100 лет деятельности и напрямую связана с истоками русской иммунологической науки.