

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

© Коллектив авторов, 2007

М. В. Карлина, О. Н. Пожарицкая, С. А. Иванова

ФАРМАКОКИНЕТИКА КУРКУМИНОИДОВ В СОСТАВЕ ПРЕПАРАТА “АРТРОФЛЕКС”

Межрегиональный центр “Адаптоген”, Санкт-Петербург

Экстракт корней куркумы (*Curcuma longa*), основными действующими веществами которого являются куркуминоиды, широко применяют в качестве противовоспалительного средства. Цель настоящей работы состояла в том, чтобы оценить биологическую доступность и параметры фармакокинетики куркуминоидов, входящих в состав комплексного препарата “Артрофлекс”, в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В ходе работы изучен процесс высвобождения куркуминоидов из субстанции и препарата в нетрадиционную двухфазную систему, имитирующую условия желудочно-кишечного тракта, рассчитаны константы скорости растворения. Изучена фармакокинетика куркуминоидов в условиях *in vivo*. Установлено, что куркумин в плазме в нативном виде отсутствует; обнаружены методом ВЭТСХ два метаболита куркуминоидов, для преобладающего метаболита рассчитаны основные параметры фармакокинетики.

Куркуминоиды — действующие компоненты экстракта корней куркумы длинной (*Curcuma longa*) — многолетнего растения семейства имбирных (*Zingiberaceae*). Эта широко известная пряность издавна используется в индийской медицине в качестве средства для лечения ран, укусов, дерматитов, простудных заболеваний, атеросклероза и т. д.

Структурные формулы основных куркуминоидов приведены на рисунке (рис. 1), преобладающим компонентом является куркумин (около 70 %).

Куркумин находит применение в медицине в качестве противовоспалительного [1] и противоопухолевого средства, обладает антиоксидантным действием [2]. Кроме того, показано, что куркумин способствует защите печени животных при гепатотоксических воздействиях, включая четыреххлористый углерод, галактозамин, ацетаминофен [3, 4].

Целью настоящей работы стало изучение биологической доступности куркуминоидов, входящих в состав препарата “Артрофлекс”, *in vitro* и определение параметров фармакокинетики в эксперименте *in vivo*.

Экспериментальная часть

Объектом исследования служил опытный образец препарата “Артрофлекс” в виде мягких желатиновых капсул и куркумин (Fluka, Германия), состоящий из суммы 3 основных куркуминоидов. В состав препарата входят масляный экстракт корней куркумы, экстракт босвеллии (*Boswellia serrata*) и масляный экстракт семян сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica*).

Высвобождение куркумина из препарата и субстанции определяли на тестере для проверки растворения “Erweka” серии 600 методом “вращающаяся мешалка”. Температура 37 ± 1 °С, скорость вращения лопасти 100 об/мин, среда растворения — двухфазная система фосфатный бу-

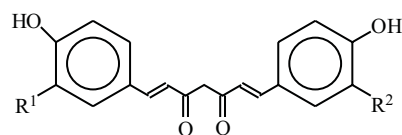
фер — октанол, 3:1, общий объем среды растворения 400 мл. По истечению заданных промежутков времени (15, 30, 45 мин и 1, 2, 3, 4, 5 ч) отбирали пробы по 5 мл октанола, объем восполняли тем же растворителем.

Определение массовой доли куркуминоидов проводили методом прямой спектрофотометрии. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре “Shimadzu” при длине волны максимума 432 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца куркумина в октанол.

Изучение фармакокинетики артрофлекса проводили на 40 беспородных белых крысах (200 – 250 г), полученных из питомника “Рапполово” (Ленинградская область).

Содержимое артрофлекса вводили голодавшим в течение 12 ч животным однократно перорально в дозе 1500 мг/кг. Пробы отбирали через 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36 ч. Количество крыс на одну временную точку — 4.

Образцы крови крыс отбирали после декапитации животных. Отобранные пробы крови центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин для получения плазмы. К 1 мл плазмы добавляли 50 мкл кислоты хлористоводородной 0,1 н. и проводили экстракцию тройным объемом этилацетата, супернатант отделяли, и проводили повторную экстракцию двойным объемом того же рас-



$R^1 = R^2 = \text{OCH}_3$ куркумин,
 $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{OCH}_3$ деметоксикуркумин,
 $R^1 = R^2 = \text{H}$ бисдеметоксикуркумин

Рис. 1. Структурные формулы основных куркуминоидов

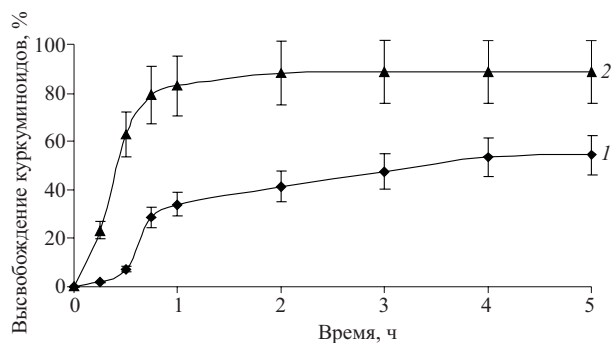


Рис. 2. Высвобождение куркуминоидов из субстанции и препарата артрофлекс: 1 – субстанция, 2 – артрофлекс

творителя, органический слой отделяли, затем полученные супернатанты объединяли, растворитель удаляли. Сухой остаток растворяли в метаноле и использовали для анализа.

В качестве контрольного образца была использована плазма крови интактных животных, пробоподготовка которой была идентична пробоподготовке плазмы крови подопытных животных.

Исследование содержания куркуминоидов в плазме проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). В качестве сорбента использовали пластины “Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ” (Ленхром, Россия). Нанесение проб на пластины осуществляли с помощью полуавтоматического аппликатора Linomat V (Camag, Muttenz, Швейцария) в виде полосы шириной 8 мм. Элюирование осуществляли в стеклянной камере системой растворителей гексан–этилацетат–уксусная кислота (85:25:5 по объему) на расстоянии 70 мм. Детектирование пластин осуществляли на сканирующем спектроденситометре TLC Scanner 3 (Camag, Muttenz, Швейцария) при 420 нм. Количественное содержание определяемых компонентов рассчитывали методом внешнего стандарта. В качестве стандарта использовали субстанцию куркумина (Fluka, Германия). Валидационные характеристики метода приведены в табл. 1.

Параметры фармакокинетики рассчитывали методом статистических моментов [5].

Результаты и их обсуждение

В состав препарата артрофлекса, кроме куркуминоидов, входит экстракт *Boswellia serrata*, действующие вещества (пентациклические тритерпеновые кислоты) которого характеризуются низкой растворимостью в воде и высокой гидрофобностью, поэтому для изучения скорости их высвобождения было невозможно применить тра-

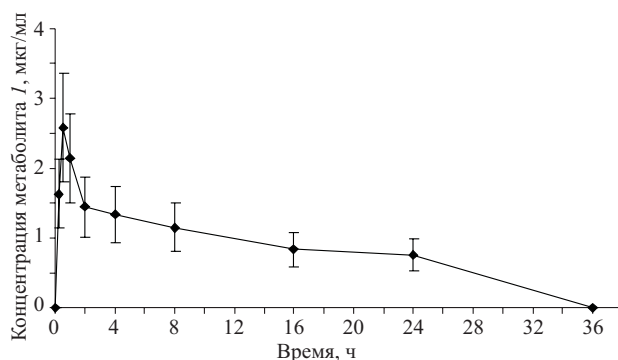


Рис. 3. Кривая “концентрация — время” метаболита I куркумина в плазме крови при пероральном введении артрофлекса

диционные среды растворения, имитирующие условия желудочно-кишечного тракта (вода, растворы кислот, буферные растворы и т. п.). Особой проблемой является отсутствие официально разработанных методик растворения для липофильных лекарственных форм, в частности твердых и мягких желатиновых капсул с липофильным содержимым [6].

Для изучения высвобождения *in vitro* липофильных, нерастворимых в воде препаратов, помещенных в мягкие желатиновые капсулы, применили двухфазную систему фосфатный буфер — октанол в соотношении 3:1 [6]. Данная система по нашему опыту [7] оказалась применима для изучения скорости растворения как босвеллиевых кислот, так и куркуминоидов.

Результаты по высвобождению куркуминоидов из препарата и из субстанции приведены на рис. 2.

Из данных, приведенных на рис. 2, видно, что кривая высвобождения куркуминоидов из артрофлекса носит линейный характер, основная часть (около 90 %) растворяется за первые 45 мин. Высвобождение куркуминоидов из субстанции протекает значительно медленнее и к 5 ч эксперимента достигает только 50 %.

После линеаризации кривых высвобождения установлено, что для описания процесса высвобождения куркуминоидов из препарата наиболее подходит уравнение кинетики первого порядка ($r = 0,9550$), константа скорости растворения, рассчитанная методом наименьших квадратов, составляет $1,9144 \text{ мин}^{-1}$. Константа скорости растворения куркуминоидов из субстанции составляет $0,1923$.

В ходе изучения фармакокинетики артрофлекса в анализируемых образцах плазмы крови крыс куркумин в чистом виде обнаружить не удалось, однако по положению на пластине были выделены два метаболита, основным из которых является метаболит I.

Характеристика методики количественного определения куркумина методом ТСХ

Таблица 1

Показатель	Длина волны детектирования (λ , нм)	Уравнение регрессии ^{а)}	R^2	Sdv, %	Предел, нг	
					линейности	количественного определения
Сумма куркуминоидов	420	$Y = 1594,026 + 37,003x$	0,99994	0,39	100 – 200	50

^{а)} x — количество куркуминоидов, нг; Y — площадь пика в а. е.

Показатели фармакокинетики метаболита 1 при однократном пероральном введении артрофлекса

T_{\max} , ч	C_{\max} , мкг/мл	AUC_{∞} , ч · мкг/мл	MRT , ч	Cl , мл/ч/кг	V_{β} , мл/кг	$T_{1/2}$, ч	k_{el} , ч ⁻¹
0,5	2,579	30,296	12,085	99,023	1196,730	8,380	0,082

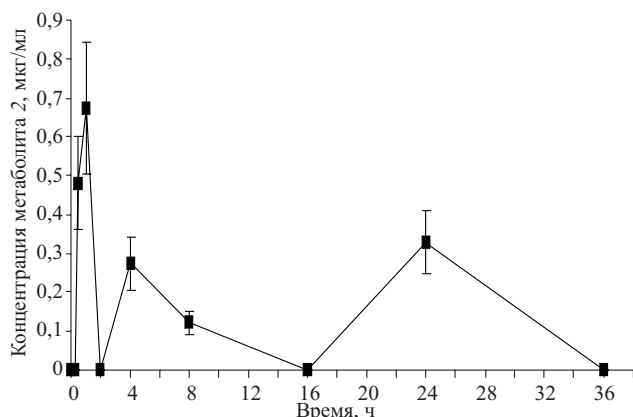


Рис. 4. Кривая “концентрация — время” метаболита 2 куркумина в плазме крови при пероральном введении артрофлекса

Динамика обнаружения метаболита 1 куркумина в плазме носит характерную для перорально применяемых лекарственных средств форму “прибойной волны”. Максимальная концентрация соединения достигается к 30 мин эксперимента и составляет около 2,6 мкг/мл. Затем концентрация метаболита в крови постепенно снижается и к 4 ч составляет 52 % от максимальной, к 36 ч метаболит в плазме не обнаруживается (рис. 3).

Параметры фармакокинетики метаболита 1 куркумина приведены в табл. 2.

Показано, что максимальная концентрация метаболита 1 в плазме крови достигается достаточно быстро — за первые 30 мин, что говорит о быстрой абсорбции куркумина в желудочно-кишечном тракте. Исследуемый метаболит имеет короткий период полувыведения — 8 ч. Объем распределения значительно превышает физический объем циркулирующей крови, что позволяет сделать вывод, что содержание метаболита в тканях будет характеризоваться большей концентрацией, по сравнению с концентрацией внутри сосудистого русла.

Учитывая спектральные характеристики исследуемого соединения (максимумы поглощения при 250 и 350 нм и плечо в области 380 – 425 нм), которые отличаются от

куркумина, значение R_f и литературные данные о возможных метаболитах куркумина, можно предположить, что данный метаболит — продукт восстановления исходного вещества до тетрагидрокуркумина [8].

Динамика обнаружения метаболита 2 в крови носит прерывистый характер (рис. 4). Максимальная концентрация метаболита достигается к 1 ч эксперимента и составляет около 0,7 мкг/мл, на 2-ом часу в плазме крови он не обнаружен. Затем, на 4 часу метаболит снова появляется, и его концентрация составляет около 0,3 мкг/мл, к 16 ч содержание его в плазме снижается до нуля, следующее увеличение концентрации (до 0,4 мкг/мл) наблюдается через сутки, через 36 ч метаболит в плазме крови не обнаружен.

Подобная картина, по-видимому, может быть связана с тем, что метаболизм куркумина протекает как в слизистой оболочке кишечника, так и в печени, а также с возможностью перехода одного метаболита в другой [8].

Авторы выражают благодарность ОАО “Завод экологической техники и экопитания “Диод” (Москва) за финансовую поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. P. R. Holt, S. Katz, and R. Kirshoff, *Digestive Diseases Sci.*, **50**(11), 2191 – 2193 (2005).
2. C. R. Ireson, D. J. Jones, S. Orr, et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, **11**(1), 105 – 111 (2002).
3. Y. Kiso, Y. Suzuki, N. Watanabe, et al., *Planta Med.*, **49**, 185 – 187 (1983).
4. E. J. Park, C. H. Jeon, G. Ko, et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**, 437 – 440 (2000).
5. В. К. Пиотровский, *Фармакол. токсикол.*, **49**(5), 118 – 127 (1986).
6. V. Pillay and R. Fassihi, *Pharm. Sci.*, **88**(9), 843 – 851 (1999).
7. М. В. Карлина, А. Ю. Ещенко, О. Н. Пожарицкая, Г. И. Дьячук, *VIII междунар. съезд “Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения”*, 21 – 23 июня 2004, Миккелли, Финляндия (2004), сс. 665 – 669.
8. Pan Min-Hiung, Huang Tsang-Miao, Jen-Kunlin, *Drug Metabolism and disposition*, **27**(1), 486 – 494 (1999).

Поступила 11.12.06

PHARMACOKINETICS OF CURCUMINOIDS CONTAINED IN ARTHROFLEX PREPARATION

M. V. Karlina, O. N. Pozharitskaya, and S. A. Ivanova

Inter-Regional Center “Adaptogen”, St. Petersburg, Russia

Curcuminoids are the main compounds in the extract of curcuma roots (*Curcuma longa*), which is widely used as an anti-inflammatory remedy. We have studied the bioavailability and determined the parameters of pharmacokinetics of curcuminoids, contained in a complex drug preparation Arthroflex, in experiments *in vitro* and *in vivo*. The release of curcuminoids from Arthroflex into a nonconventional biphasic system modeling conditions in the gastrointestinal tract was investigated *in vitro* and the dissolution rate constants were calculated. The pharmacokinetics of curcuminoids was investigated *in vivo*. It was established that curcumin in the initial form is missing from the blood plasma, and only two metabolites of curcuminoids were found by the HPTLC method. The parameters of pharmacokinetics of the main metabolite were determined.