

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

© Коллектив авторов, 2007

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

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОСТУПНОСТИ БОСВЕЛЛИЕВЫХ КИСЛОТ: *in vitro* / *in vivo* КОРРЕЛЯЦИЯ

Межрегиональный центр "Адаптоген", Санкт-Петербург

Экстракт *Boswellia serrata* (ладанного дерева), основными действующими веществами которого являются тритерпеновые соединения, широко применяют для лечения ревматического артрита и подагры. Босвеллиевые кислоты — тритерпеновые пентациклические соединения — имеют крайне низкую растворимость в воде и достаточно высокую липофильность ($\log P$). Цель настоящей работы состояла в том, чтобы оценить и показать фактическую пригодность и общую применимость предложенного *in vitro* метода для оценки и предсказания возможной абсорбции лекарственного средства *in vivo* путем установления корреляционных связей между результатами, полученными *in vivo* и *in vitro*. В ходе работы изучили процесс высвобождения 4 основных босвеллиевых кислот из экстракта *B. serrata* в нетрадиционную двухфазную систему, имитирующую условия желудочно-кишечного тракта. Рассчитаны константы скорости растворения босвеллиевых кислот. Изучены параметры фармакокинетики кетокислот в условиях *in vivo*. Установлены корреляционные зависимости между параметрами экспериментальной фармакокинетики кетокислот и скоростью их высвобождения *in vitro*. Исследование биодоступности показало, что существует сильная корреляционная связь между результатами *in vivo* и скоростью растворения босвеллиевых кислот в двухфазную среду растворения. Данный факт позволяет прогнозировать экспериментальный фармакокинетический профиль индивидуальных босвеллиевых кислот при энтеральном введении экстракта *B. serrata*, исходя из скорости их высвобождения *in vitro*.

Применение камедесмолы босвеллии (*Boswellia serrata*) уходит корнями в глубокую древность. Как известно, окуривание ладаном в обрядовых целях имеет очень давнюю историю. Тогда же были замечены обеззараживающие, "очищающие" свойства дыма. Сейчас камедесмолу босвеллии широко используют в народной медицине и Аюрведе как противовоспалительное, жаропонижающее, противодизентерийное, диуретическое, противораковое, антианафилактическое, витаминное, антиоксидантное средство, как блокатор кальциевых каналов и т. д. Но в основном, как в народной, так и в официальной медицине экстракт босвеллии применяют в качестве противовоспалительного средства при артритах и подагре [1].

Фармакологические эффекты связывают, в основном, с присутствием в экстрактах пента- и тетрациклических тритерпеновых кислот, сходных по структуре с противовоспалительными стероидными соединениями [2]. Босвеллиевые кислоты имеют свойства, довольно типичные для субстанций "нового поколения", — крайне низкую растворимость в воде и достаточно высокую липофильность ($\log P$). Известно, что количество адсорбируемого вещества зависит от различных факторов, таких как растворимость, проницаемость, объем жидкости в кишечнике, время прохождения через желудочно-кишечный тракт [3]. В случае плохо растворимых, липофильных препаратов (отно-

сящихся к классу II) [4], основным лимитирующим фактором оральной биодоступности является растворимость лекарственного средства.

Необходимым этапом в изучении новых лекарственных средств является исследование процессов, характеризующих фармакокинетический профиль вещества: абсорбции, распределения, метаболизма и экскреции [5]. Традиционно вышеперечисленные процессы изучают *in vivo* в экспериментах на лабораторных животных. Однако таким экспериментам должно предшествовать изучение доступности *in vitro*. В связи с вышесказанным возникает проблема выявления корреляции между результатами экспериментов, проводимых *in vitro* и *in vivo*. Как правило, рассматривают корреляционные соотношения между параметрами теста "Растворение" (процента вещества, растворившегося за определенный промежуток времени, или, наоборот, время, необходимое для растворения определенного процента вещества) и параметрами фармакокинетики [6]. Кроме того, в усилиях минимизировать испытания на людях, исследование *in vitro* / *in vivo* корреляции между *in vitro* растворением и *in vivo* биодоступностью становится неотъемлемой частью разработки нового лекарственного средства [7].

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы оценить и показать фактическую пригодность и общую применимость предложенного *in vitro* метода для

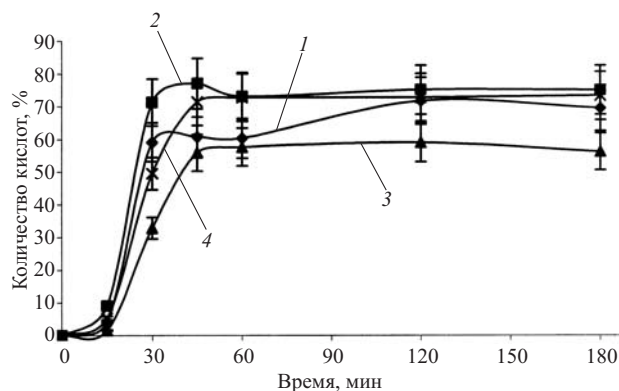


Рис. 1. Высвобождение босвеллиевых кислот из экстракта *Boswellia serrata*: БК (1), АБК (2), КБК (3), АКБК (4).

оценки и предсказания возможной абсорбции лекарственного средства *in vivo* путем установления корреляционных связей между результатами, полученными *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы

В работе использовали сухой экстракт *Boswellia serrata* с содержанием босвеллиевых кислот не менее 85 % (New Ambadi Estates Pvt. Ltd., India). Идентификацию и количественное определение проводили с использованием стандартных образцов β-босвеллиевой (БК), ацетил-β-босвеллиевой (АБК), 11-кето-босвеллиевой (КБА) и ацетил-11-кето-босвеллиевой (АКБА) кислот (Phytoplan, Германия).

Оценку скорости высвобождения *in vitro* проводили с использованием теста “Растворение” на приборе типа “вращающаяся мешалка” (Тип DT 600, Erweka, Германия) при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Скорость вращения мешалки 100 об/мин. Пробы отбирали через определенные промежутки времени (15, 30, 45 мин и 1, 2, 3, 4, 5 ч), фильтровали и использовали для количественного определения методом ВЭЖХ. Для изучения скорости высвобождения экстракт *Boswellia serrata* в количестве 100 мг помещали в твердую желатиновую капсулу.

Содержание босвеллиевых кислот в пробах определяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе высокого давления “Waters” (США) с УФ-детектором и колонкой Luna C₁₈ 4,6 × 150 мм (размер частиц сорбента 5 мкм) с предколонкой длиной 2,0 мм, заполненной тем же сорбентом. Использовали градиентное элюирование от 75 % ацетонитрила в 0,03 %

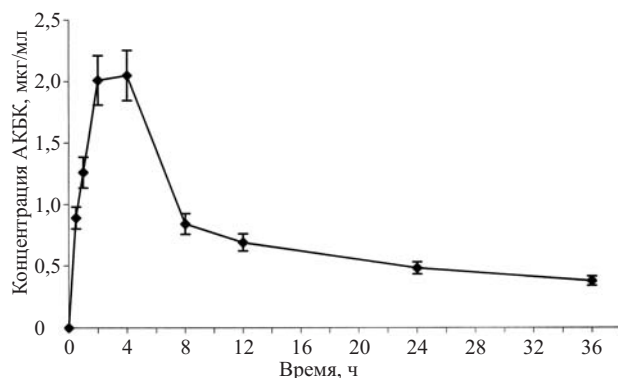


Рис. 2. Кривая “концентрация – время” АКБК при пероральном введении экстракта *Boswellia serrata*.

растворе трифторуксусной кислоты до 100 % ацетонитрила за 20 мин. Скорость потока элюента 1,0 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл. Длины волны детектирования 254 и 210 нм. Идентификацию и количественный анализ проводили методом внешнего стандарта с использованием стандартных образцов босвеллиевых кислот.

Уравнения линейной регрессии, величина достоверности аппроксимации (R^2) и пределы обнаружения для БК, АБК, КБК и АКБК представлены в табл. 1.

Изучение фармакокинетики экстракта *Boswellia serrata* проводили на 40 беспородных белых крысах массой 150 – 200 г. Экстракт вводили голодавшим в течение 12 ч животным в виде 10 % масляной суспензии однократно перорально в дозе 200 мг/кг. Пробы отбирали через 30 мин и 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36 ч.

Отобранные пробы крови центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин для получения плазмы. Депротенинизацию проводили ацетоном (полуторный объем) с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин, супернатанты отделяли, проводили экстракцию хлороформом (двойной объем). Хлороформный экстракт отделяли, растворитель удаляли. Сухой остаток растворяли в метаноле. Параметры фармакокинетики рассчитывали внемодельным методом — методом статистических моментов [8].

Исследование содержания босвеллиевых кислот в плазме проводили методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). В работе использовали готовые пластины Kieselgel 60 F 254 (Merck, Германия). Элюирование осуществляли в стеклянной камере системой растворителей гексан – этилацетат – уксусная кислота (85:20:5). Детектирование пластин

Таблица 1

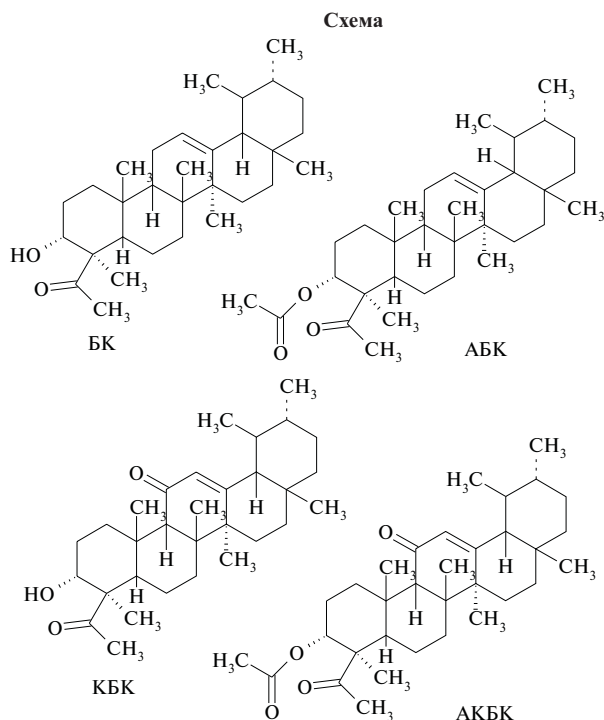
Параметры валидации методики ВЭЖХ

Кислота	Уравнение регрессии	R^2	Предел обнаружения, мкг на ввод
КБК	$Y = 0,000039x - 0,00005$	0,99999	0,02
АКБК	$Y = 0,000036x - 0,00135$	0,99989	0,02
БК	$y = 0,00019x - 0,00449$	0,99928	0,12
АБК	$y = 0,00024x - 0,00293$	0,99297	0,12

Таблица 2

Параметры валидации методики ВЭТСХ

Кислота	Уравнение регрессии	R^2	Предел обнаружения, мкг на пластине
КБК	$Y = 28,490 + 0,257x$	0,99276	0,15
АКБК	$Y = 13,606 + 0,271x$	0,99106	0,15
БК	$y = 324,512 + 0,238x$	0,99638	0,10
АБК	$y = 195,427 + 0,272x$	0,99007	0,10



Структурные формулы основных босвеллиевых кислот

осуществляли на сканирующем спектроденситометре TLC Scanner 3 (Camag, Швейцария) при 254 нм (для определения КБА и АКБА) и при 560 нм после дериватизации пластины (для определения БА и АБК). Для дериватизации пластину обрабатывали реагентом, содержащим анисовый альдегид и серную кислоту, и нагревали при 100 – 110 °С в течение 5 – 10 мин. Количественное содержание босвеллиевых кислот рассчитывали методом внешнего стандарта с использованием стандартных образцов босвеллиевых кислот.

Уравнения линейной регрессии, величина достоверности аппроксимации (R^2) и пределы обнаружения для БК, АБК, КБК и АКБК представлены в табл. 2.

Результаты и их обсуждение

Оценку скорости высвобождения *in vitro* проводили по 4 основным босвеллиевым кислотам, структурные формулы которых представлены на схеме.

Предварительно методом обращено-фазовой ВЭЖХ определили содержание индивидуальных кислот в экстракте *Boswellia serrata* (%): КБК — 3,8; АКБК — 3,9; БК — 18,9; АБК — 11,9.

Известно, что исследуемые кислоты нерастворимы в воде и обладают выраженными гидрофобными свойствами, поэтому для изучения скорости их высвобождения невозможно применить традиционные среды растворения, такие как вода и буферные растворы, имитирующие условия желудочно-кишечного тракта. Теоретически рассчитанный коэффициент распределения октанол – вода ($\log P$) для босвеллиевых кислот составляет $9,38 \pm 0,39$ и $10,27 \pm 0,40$ для БК и АБК соответственно; для кетокислот — $7,10 \pm 0,39$ и $8,00 \pm 0,28$ для КБК и АКБК соответственно. Однако

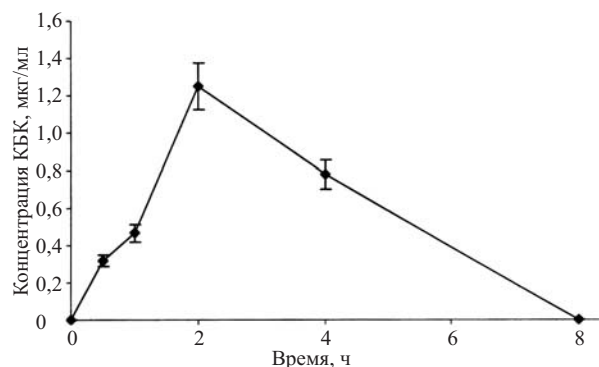


Рис. 3. Кривая “концентрация – время” КБК при пероральном введении экстракта *Boswellia serrata*

введение в состав среды растворения сурфактантов, фосфолипидов или компонентов желчи не приводило к увеличению степени растворения босвеллиевых кислот. В связи с выше сказанным, нами была использована двухфазная среда растворения [9]. На основании ранее полученных экспериментальных данных в качестве среды при изучении растворения босвеллиевых кислот выбрали фосфатный буфер — октанол в соотношении 3:1 [10]. Полученные результаты приведены на рис. 1.

Из данных, приведенных на рис. 1, видно, что высвобождение кислот начинается с небольшой задержкой, обусловленной растворением желатиновой оболочки, основное их количество переходит в октанол за первые 45 мин эксперимента. Константы скорости растворения, рассчитанные методом наименьших квадратов, составили $1,3914 \text{ мин}^{-1}$ для БК, $1,634 \text{ мин}^{-1}$ для АБК, $0,6678 \text{ мин}^{-1}$ для КБК и $1,5721 \text{ мин}^{-1}$ для АКБК.

Кинетика обнаружения в плазме крови крыс была изучена для 2 кислот КБК и АКБК, количественное определение которых проводили методом ВЭТСХ (рис. 2, 3).

Кинетика обнаружения АКБК (рис. 2) в крови носит характерную для перорально применяемых средств форму “прибойной волны”. Максимум концентрации достигается через 2 ч и составляет около 2 мкг/мл. С 2 до 4 ч концентрация кислоты в плазме крови практически не изменяется, затем наблюдается постепенное снижение содержания кислоты в плазме и к 36 ч ее концентрация составляет 19 % от максимальной.

Рассчитанные параметры фармакокинетики приведены в табл. 3.

Таблица 3
Показатели фармакокинетики АКБК и КБК при однократном пероральном введении экстракта *Boswellia serrata*

Кислота	T_{\max} , ч	C_{\max} , мкг/мл	$AUC_{0-\infty}$, ч мкг/мл	MRT , ч	Cl , мл/ч/кг	V_{ss} , мл/кг	$T_{1/2}$, ч
АКБК	2	2,01	34,131	17,944	228,53	4100,74	12,4
КБК	2	1,250	4,725	2,866	1608,46	4609,85	2,98

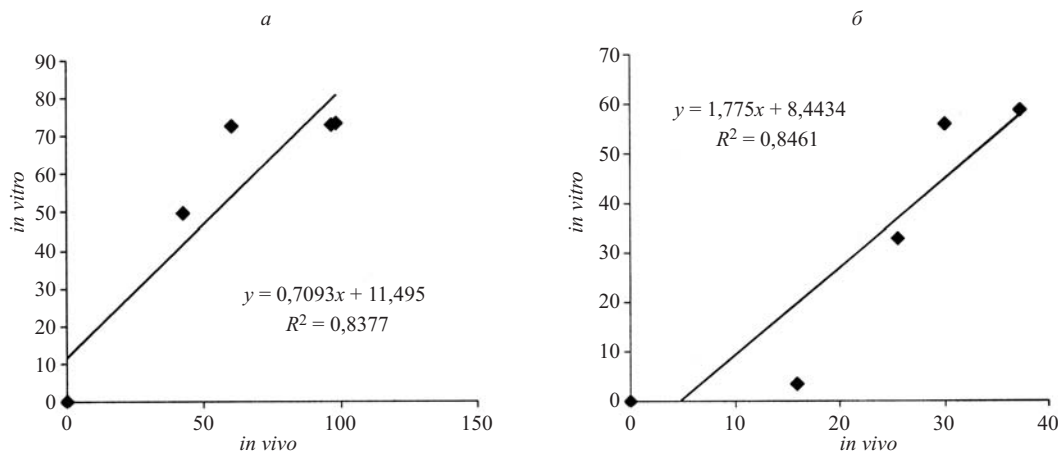


Рис. 4. *In vitro/in vivo* корреляция для АКБК (а) и КБК (б).

Кинетика обнаружения КБК (рис. 3) в плазме крови также носит характерную для перорально применяемых средств форму. Максимум концентрации достигается к 2 ч и составляет 1,25 мкг/мл, затем наблюдается быстрое снижение содержания кислоты в крови и через 8 ч эксперимента КБК уже не обнаруживается (рис. 3).

Для определения корреляции между результатами, полученными для кетокилот в условиях *in vitro* и *in vivo* рассчитывали процент абсорбции кетокилот методом линейной интерполяции. Коэффициенты корреляции составили 0,8377 и 0,8461 для АКБК и КБК соответственно. Полученные результаты приведены на рис. 4.

Исследование биодоступности показало, что существует сильная корреляционная связь уровня А между результатами *in vivo* и скоростью растворения босвеллиевых кислот в двухфазную среду растворения. Данный факт позволяет прогнозировать экспериментальный фармакокинетический профиль АКБК и КБК при

энтеральном введении экстракта *Boswellia serrata*, исходя из скорости их высвобождения *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. H. Safayhi, S. E. Boden, S. Schweizer, H. P. T. Ammon, *Planta Med.*, **66**, 110 – 113 (2000).
2. H. P. Ammon, *Wien Med. Wochenschr.*, **152**(15, 16), 373 – 378 (2002).
3. D. A. Wyatt, *Bull. Techn. Gattefosse*, **92**, 31 – 39 (1999).
4. G. L. Amidon, H. Lennernäs, V. P. Shah, and J. R. Crison, *Pharm. Res.*, **12**, 413 – 420 (1995).
5. Н. Н. Каркищенко, В. В. Хоронько, С. А. Сергеева и др., *Фармакокинетика*, Феникс, Ростов-на-Дону (2001).
6. J. Emami, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **9**(1), 82 – 100 (2006).
7. V. R. S. Upoor, *J. Control. Rel.*, **72**(1 – 3), 127 – 132 (2001).
8. В. К. Пиотровский, *Фармакол. токсикол.*, **49**(5), 118 – 127 (1986).
9. V. Pillay and R. Fassihi, *Pharm. Sci.*, **88**(9), 843 – 851 (1999).
10. М. В. Карлина, А. Ю. Ещенко, Г. И. Дьячук, О. Н. Пожарицкая, *Материалы IX Международного съезда "Актуальные проблемы создания новых лекарственных средств природного происхождения" Фитофарм 2005*, Санкт-Петербург (2005), сс. 754 – 759.

Поступила 11.05.06

BIOAVAILABILITY OF BOSWELIC ACIDS: *in vitro* / *in vivo* CORRELATION

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

Inter-Regional Center "Adaptogen", St. Petersburg, Russia

Extract of *Boswellia sacra* (incense tree), the main active components of which are boswellic acids, is used for the treatment of rheumatoid arthritis and gout. Boswellic acids suppress leukotriene biosynthesis in neutrophilic granulocytes by non-redox, noncompetitive inhibition of 5-lipoxygenase. Pentacyclic triterpenoid boswellic acids have poor solubility in water and are highly lipophilic ($\log P = 7 - 10.3$). Bioavailability of the *B. sacra* (BS) extract has been studied using a new method developed for estimating and predicting the possible absorption of medicinal substances *in vivo*, which is based on the establishment of a correlation between the data obtained *in vivo* and *in vitro*. The validity and applicability of the proposed method is demonstrated. Release of four individual boswellic acids from BS extract has been studied *in vitro* using a nonconventional two-phase system simulating conditions in the gastrointestinal tract. Based on these data, the dissolution rate constants of boswellic acids were calculated. At the same time, the parameters of pharmacokinetics of ketoacids *in vivo* were determined and a correlation between these parameters and the rate of release *in vitro* was studied. It is established that there is a strong correlation between the results obtained *in vivo* and the dissolution of boswellic acids in the model two-phase medium *in vitro*, which makes possible the prediction of experimental pharmacokinetic profiles of individual acids upon *per os* administration of BS extract.