

Л. К. Циклаури¹, Г. Ан², М. Д. Алания¹, Э. П. Кемертелидзе¹, М. Е. Моррис²

ОПТИМАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ВЭЖХ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА РОБИНИНА И КЕМПФЕРОЛА

¹ Институт фармакохимии им. И. Г. Кутателадзе, Тбилиси, Грузия;

² Факультет фармации, Университет Буффало, штат Нью-Йорк, США

Разработана методика ВЭЖХ для одновременного количественного определения робинина и его агликона — кемпферола — в клетках линии MCF-7 карциномы молочной железы человека. Сепарирование робинина и кемпферола было достигнуто использованием колонки Platinum EPS C-18 с размером 4,6 × 250 мм и диаметром частиц 5 мкм при длине волны 380 нм. Подвижная фаза состояла из раствора А) 5% раствор метанола в 0,01 М фосфатном буфере с рН 2,0, и Б) смесь тетрагидрофуран — изопропанол — метанол — вода (150 : 200 : 67,5 : 32,5) в соотношении 60:40 (А:Б). Калибровочные кривые для обоих веществ были линейными ($R^2 = 0,9997$, $R^2 = 1$) в выбранном диапазоне концентраций 25 – 1000 нг/мл. Коэффициент вариации метода в течение суток и между сутками составил 1,31 – 8,92 %, а степень обнаружения находилась в диапазоне 97,3 – 104,6 %. Робинин — флавоноидный гликозид, выделенный из листьев и цветков *Astragalus falcatus*, обладает свойством понижать уровень остаточного азота, креатина и мочевины в крови, и созданная из него готовая лекарственная форма в таблетках — препарат фларонин — применяется при азотемии, вызванной хронической недостаточностью почек.

Ключевые слова: *Astragalus falcatus* L., робинин, кемпферол, ВЭЖХ, MCF-7 (wt).

Флавоноиды — одни из самых многочисленных природных биологически активных соединений — привлекают внимание широким спектром фармакологических свойств и разнообразностью медицинского применения [1, 2].

Однако при пероральном введении в организм степень биодоступности флавоноидов незначительна. Это частично обусловлено их взаимодействием с мембранными транспортерами и ферментами [3 – 5]. Процесс выброса препаратов из клеток осуществляется представителями большой группы энергетически зависимых мембранных белков — АВС-транспортеров (АТФ-binding cassette transporters), в частности, общепризнанным маркером множественной лекарственной резистентности — Р_{gp} (P-Glycoprotein), физиологическая роль которого заключается в защите организма от экзогенных и эндогенных токсинов. Р_{gp} локализуется в тканях толстой и ободочной кишки, печени, почках и оказывает влияние на абсорбцию и элиминацию своих субстратов [6].

В Институте фармакохимии им. И. Г. Кутателадзе Академии наук Грузии на основе флавоноидного гликозида робинина — кемпферол-3-О-β-робинобиозил-7-О-α-L-рамнопиранозид, выделенного из листьев и цветков *Astragalus falcatus* Lam., был разработан препарат “Фларонин” в форме таблеток, с успехом применяемый в медицине при азотемии, вызванной хронической почечной недостаточностью [7].

В литературе имеются сведения об абсорбции и биологической доступности некоторых флавоногликозидов, но относительно робинина есть указание лишь о том, что кишечной микрофлорой он гидролизруется до кемпферола [4, 5, 10 – 12].

Для изучения биодоступности активной субстанции лекарственного препарата фларонина — робинина

— стала необходимой разработка методики одновременного количественного анализа робинина и его агликона — кемпферола в клеточных лизатах. Наиболее приемлемым для этого является ВЭЖХ.

Экспериментальная часть

Работа выполнена на жидкостном хроматографе Waters с насосом модели 1525, инжектором — 717 plus, автосамплером вместимостью 30 мкл и программным обеспечением обработки хроматографических данных Waters Breeze. В опытах использован УФ-детектор модели 2847 при 380 нм.

Оптимальное разделение высоколипофильного кемпферола и менее липофильного робинина от внутреннего стандарта (ВС) достигается в режиме обращенно-фазного элюирования на колонке Platinum EPS C-18 (Alltech Associates, Inc.), характеризующейся широкой селективностью; размер колонки — 4,6 × 250 мм, диаметр частиц — 5 мкм.

Для подбора подвижной фазы испытывали смесь тетрагидрофуран — метанол — изопропанол с различными буферными растворами, а также водные растворы ацетонитрила. Наиболее селективной оказалась подвижная фаза, состоящая из смеси растворов: А) 5 % раствор метанола в 0,01 М фосфатном буфере с рН 2,0; Б) тетрагидрофуран — изопропанол — метанол — вода, 150:200:67,5:32,5 в соотношении 60:40 (А:Б). В качестве ВС служил фисетин. Элюирование проводили в изократическом режиме; скорость потока 1 мл/мин. Продолжительность анализа — 15 мин. Подвижную фазу предварительно пропускали через мембранный фильтр с порами диаметром 0,45 мкм, а затем дегазировали под вакуумом. Время удерживания

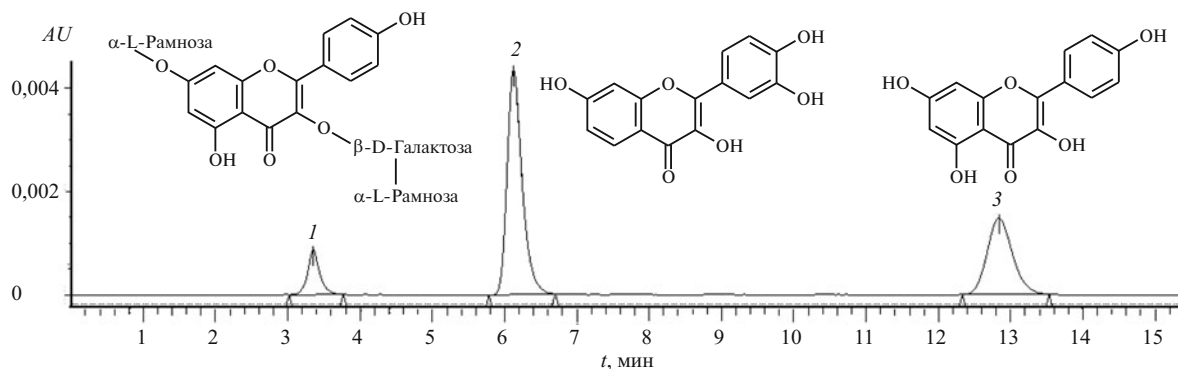


Рис. 1. Хроматограмма раствора, содержащего по 1 мкг/мл робинина (1), фисетина (2) и кемпферола (3) в подвижной фазе.

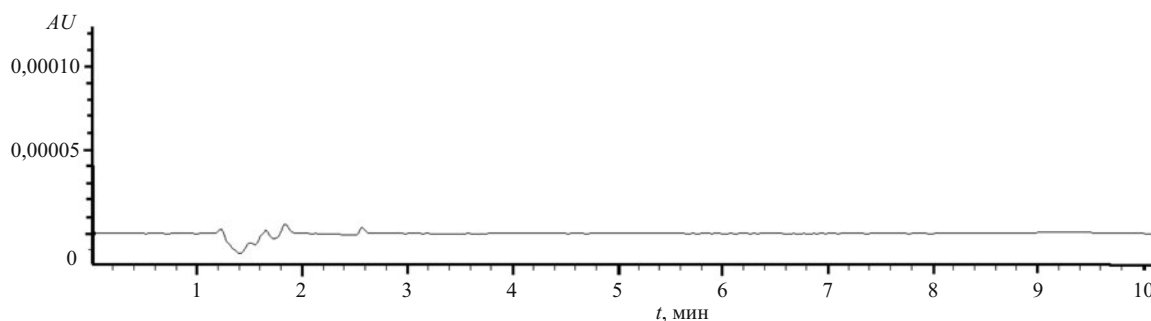


Рис. 2. Хроматограмма экстракта лизированных клеток карциномы молочной железы человека MCF-7 (wt) (плацебо).

робинина, фисетина и кемпферола составляло 3,54, 6,45 и 13,5 мин соответственно (рис. 1).

Эксперименты проводились с использованием клеток линии MCF-7 карциномы молочной железы человека, чувствительных (MCF-7 (wt)) к доксорубину, на 9–18-м пассаже культивирования. Опухолевые клетки культивировали *in vitro* в среде RPMI-1640 с добавлением 2 ммоль L-глутамин, 10 % бычьей фетальной сыворотки (FBS) (Invitrogen, США) и 1 % раствора пенициллин/стрептомицина в инкубаторе влажной атмосферы с 5 % содержанием CO₂; каждые 3 дня их субкультивировали с использованием 0,25 % раствора трипсина. Клетки собирали в их экспоненциальной фазе роста, затем промывали фосфатным солевым буфером (PBS) и лизировали с помощью 10 мл 0,5 %

раствора Triton X-100. Полученные лизаты использовались в качестве контроля (рис. 2).

Основные растворы робинина (1 мг/мл), кемпферола (1 мг/мл) и фисетина (0,25 мг/мл) готовили в ДМСО. Рабочие стандартные растворы получали разбавлением основных растворов в метаноле. Для построения калибровочных кривых образцы робинина и кемпферола добавляли в лизатах клеток в таком количестве, чтобы получить растворы с концентрацией: 25, 50, 100, 250, 500, 1000 нг/мл; количество ВС составляло 20 нг/мл. Для оценки точности и правильности методики готовили 3 концентрации (50, 100, 500 нг/мл) испытуемых веществ. Анализы проводились трижды в течение 1 дня и 5 различных дней недели (*n* = 3).

Перед вводом в хроматограф образцы депротеинизировали равным объемом метанола и центрифугиро-

Результаты анализов при валидации метода

Определяемое соединение	Истинная концентрация, мкг/мл	Проведенный анализ в течение 1 дня			Проведенный анализ в течение 1 недели		
		Измеренная концентрация, мкг/мл	Регенерация *, %	Стандартное отклонение, %	Измеренная концентрация, мкг/мл	Регенерация *, %	Стандартное отклонение, %
Робинин	0,05	0,052 ± 0,001	103,4	1,31	0,052 ± 0,005	104,6	8,92
	0,10	0,104 ± 0,002	103,9	1,44	0,102 ± 0,009	102,2	8,69
	0,50	0,495 ± 0,021	99,10	4,25	0,492 ± 0,041	98,40	8,30
Кемпферол	0,05	0,050 ± 0,001	100,4	1,48	0,050 ± 0,003	100,0	6,97
	0,10	0,100 ± 0,002	100,0	2,23	0,097 ± 0,007	97,30	6,71
	0,50	0,496 ± 0,009	99,10	1,74	0,495 ± 0,019	99,00	3,80

* — среднее из 3 определений.

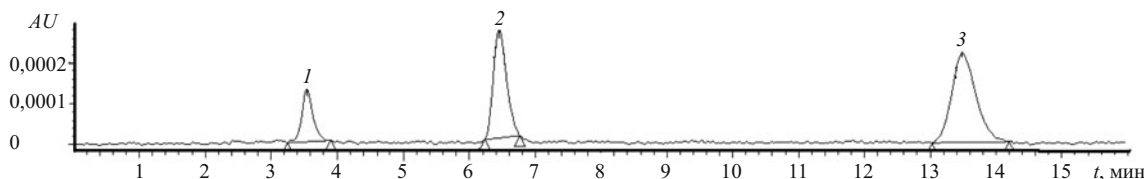


Рис. 3. Хроматограмма испытуемых веществ в лизатах карциномы клеток: 1 — робинин (50 нг/мл); 2 — фисетин (20 нг/мл); 3 — кемпферол (50 нг/мл).

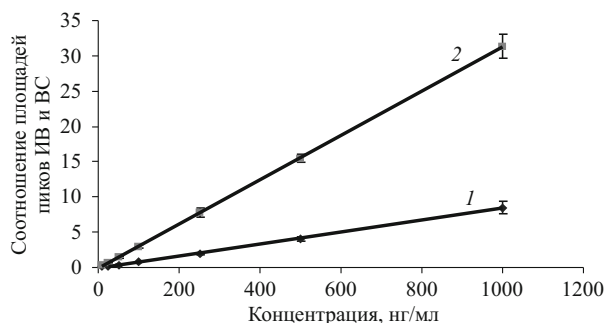


Рис. 4. Калибровочные графики стандартов исследуемых веществ (ИВ) в клеточных лизатах: 1 — робинин; 2 — кемпферол, $n = 3$.

вали со скоростью 13 000 об/мин при температуре не более 4 °С в течение 10 мин. Супернатант переносили в пробирку, добавляли двукратное количество метанола, ВС и высушивали под струей азота. Сухой остаток растворяли в 100 мкл подвижной фазы, 30 мкл из которой вводили в хроматографическую колонку. Каких-либо интерферирующих пиков, элюирующихся совместно с тест-веществами, не обнаруживалось, и разделение флавоноидов в данных условиях происходило хорошо (рис. 1 – 3).

Результаты и их обсуждение

Для валидационной характеристики разработанной методики проведен ряд экспериментов. Калибровочные графики растворов робинина и кемпферола в клеточных лизатах в диапазоне концентраций 25 – 1000 нг/мл были линейными (рис. 4). Уравнения регрессии принимали вид $y = 0,0084x - 0,0392$ для робинина, $y = 0,0314x - 0,0924$ — для кемпферола; коэффициенты корреляции для обеих кривых были достаточно высокими ($R^2 = 0,9997$, $R^2 = 1$), что позволяет провести точный количественный анализ.

Точность методики показывает систематические погрешности и выражается как процент регенерации точно взвешенного количества анализируемого образца. Правильность разработанной методики установлена по результатам анализа модельных смесей с использованием стандартных образцов для 3 повторностей определений из 3 аналитических концентраций. В таблице приведены результаты данной характеристики валидности. Средний показатель регенерации анализа, проведенного в течение 1 дня, составляет 102,1 % для робинина и 99,8 % кемпферола, а результаты оценки правильности находятся в интервале

98,4 – 104,6 % и 97,3 – 100 % соответственно. Следовательно, методика обладает удовлетворительной точностью.

Относительная ошибка количественного определения робинина и кемпферола проведенного в течение дня не превышает 5 и 3 %, а для пяти различных дней недели — 9 и 7 % соответственно. Таким образом, полученные средние стандартные отклонения, характеризующие воспроизводимость, свидетельствуют об отсутствии значимых систематических и случайных погрешностей.

Предел количественного определения для робинина составлял 10 нг/мл, а его агликона — 5 нг/мл ($S/N = 10$).

Эффективность извлечения из клеточных лизатов оценивалась для трех (50, 100, 500 нг/мл) концентраций ($n = 3$) сравнением площадей пиков робинина и кемпферола в растворах в подвижной фазе и клеточных лизатах. За 100 % принималось количество соединения, обнаруженное в подвижной фазе (рис. 1). Растворы анализируемых веществ в подвижной фазе вводились в хроматограф непосредственно, а клеточных лизатов — после обработки, как указано в экспериментальной части. Степень извлечения составила 61 – 70 % для обоих веществ.

Таким образом, хроматографические параметры разработанной методики свидетельствуют о пригодности подобранной системы. Методика валидирована по соответствующим параметрам, подтверждающим ее точность и воспроизводимость, и позволяет проводить одновременное количественное определение робинина и кемпферола в клеточных лизатах.

Л. К. Циклаури выражает признательность фонду Фулбрайта (Fulbright Scholarship) за присуждение стипендии, в рамках которой проведена работа.

ЛИТЕРАТУРА

1. K. R. Narayana, M. S. Reddy, M. R. Chaluvadi, et al., *Indian J. Pharmacol.*, **33**, 2 – 16 (2001).
2. P. M. Aron, J. A. Kennedy, *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**(1) 79 – 104 (2008).
3. K. D. Setchell, N. M. Brown, P. Desai, et al., *J. Nutr.*, **131**, 1362 – 1375 (2001).
4. Y. Liu, M. Hu, *Drug Metab. Dispos.*, **30**(4), 370 – 377 (2002).
5. S. Zhang, M. E. Morris, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **304**(3), 1258 – 1267 (2003).
6. M. J. Dresser, *AAPS Pharm. Sci.*, **3**(3) Commentary 3 (<http://www.aapspharmsci.org>) (2001).
7. М. Д. Алания, Э. П. Кемергелидзе, Н. Ф. Комиссаренко, *Флавоноиды некоторых видов Astragalus L. флоры Грузии*, “Мецниереба”, Тбилиси (2002), с. 151.

8. Т. Т. Сагареишвили, М. Д. Алания, Э. П. Кемертелидзе, Патент Грузии № 2072 (1998).
9. Э. П. Кемертелидзе, В. Н. Сыров, М. Д. Алания и др., *Хим-фарм. журн.*, **42**(6), 28 – 31 (2008).
10. A. J. Day, J. M. Gee, M. S. DuPont, et al., *Biochem Pharmacol.*, **65**, 1199 – 1206 (2003).
11. A. L. Sesink, I. C. Arts, M. Faassen-Peters, et al., *J. Nutr.*, **133**, 773 – 776 (2003).
12. E. G. Mimnaugh, C. R. Fairchild, J. P. Fruehauf, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **42**(2), 391 – 402 (1991).

Поступила 11.08.10

OPTIMUM HPLC PARAMETERS FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ROBININ AND KAEMPFEROL

L. K. Tsiklauri¹, G. An², M. D. Alania¹, E. P. Kemertelidze¹, and M. E. Morris²

¹ Iovel Kutateladze Institute of Pharmacochimistry, 0159 Tbilisi, Georgia;

² Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University at Buffalo, Buffalo, NY, United States

A simple, rapid and sensitive high-performance liquid chromatography (HPLC) assay in the reversed phase mode using the internal standard method has been developed and validated for the simultaneous determination of flavonoid glycoside robinin and its aglycone kaempferol in MCF 7/sensitive cells. The separation was performed on a PLATINUM EPS C18 analytical column (250 × 4.6 mm i.d., 5- μ m) using solvents (A) 5% methanol in 0.01 M phosphate buffer (pH 2.0) and (B) tetrahydrofuran – isopropanol – methanol – water (150 : 200 : 67.5 : 32.5, v/v) in 60 : 40 (A : B) isocratic elution regime. The UV detector was set at 380 nm. The calibration of robinin and its aglycone kaempferol was linear ($R^2 = 0.999$; $R^2 = 1$) over a concentration range of 25 – 1000 ng/ml. The mean recoveries were 97.3 to 104.6%; the intra- and inter-day variation coefficients were within 1.31 – 8.92%. Robinin was isolated from the leaves and flowers of *Astragalus falcatus* L. growing in Georgia. This compound decreases residual nitrogen and creatin level in circulating blood, increases urine volume, and is recommended for the treatment of chronic renal failure.

Key words: *Astragalus falcatus* L., robinin, kaempferol, HPLC, MCF 7/s cells