



Идентификация метаболитов лютеолин-7-гликозида после перорального введения и разработка методики их количественного анализа

Г. В. Адамов¹✉, О. Л. Сайбель¹, А. Н. Бабенко¹, Е. С. Мельников², А. И. Радимич¹,
О. Ю. Куляк^{1,3}, Л. В. Крепкова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР). 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова». 119192, Россия, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, корп. 1

✉ Контактное лицо: Адамов Григорий Васильевич. E-mail: grig.adamov@mail.ru

ORCID: Г. В. Адамов – <https://orcid.org/0000-0001-7347-175X>;
О. Л. Сайбель – <https://orcid.org/0000-0001-8059-5064>;
А. Н. Бабенко – <https://orcid.org/0000-0001-9629-5525>;
Е. С. Мельников – <https://orcid.org/0000-0002-8993-4808>;
А. И. Радимич – <https://orcid.org/0000-0002-1139-8902>;
О. Ю. Куляк – <https://orcid.org/0000-0003-0385-3474>;
Л. В. Крепкова – <https://orcid.org/0000-0002-3580-336X>.

Статья поступила: 07.05.2024

Статья принята в печать: 09.08.2024

Статья опубликована: 09.08.2024

Резюме

Введение. Разработка и регистрация противовирусных препаратов является актуальной задачей. Флавоноиды, в частности лютеолин-7-гликозид (цинарозид, лютеолин-7-О-гликозид), демонстрируют высокую противовирусную активность широкого спектра *in vitro*, а промышленный регламент получения лютеолин-7-гликозида из листьев ивы остролистной уже разработан в ФГБНУ ВИЛАР. Одной из проблем при внедрении флавоноидов в медицинскую практику является их низкая биодоступность и интенсивная биотрансформация. Существующие публикации приводят противоречивые данные по фармакокинетике лютеолин-7-гликозида, в связи с чем было проведено собственное исследование.

Цель. Разработать методику количественного анализа лютеолин-7-гликозида и его метаболитов в плазме крови и апробировать ее на лабораторных животных.

Материалы и методы. Эксперименты на животных проводили согласно требованиям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств». Для разработки методики анализа и дальнейшего уточнения временных интервалов отбора проб крови анализировали временные точки: через 30, 60 минут, 2, 4, 8, 24 часа после введения исследуемого вещества. Пробирки с цитратной кровью лабораторных животных центрифугировали при 2000 оборотов в минуту в течение 10 минут. Плазму помещали в пробирку типа «эппендорф», замораживали и хранили при температуре –20 °С до проведения хроматографического анализа. Пробоподготовку плазмы крови проводили методом осаждения метиловым спиртом, супернатант хроматографически разделяли на колонке Luna® C18 100 Å, 250 × 4,6 мм, 5 мкм, в градиентном режиме в системе «вода – ацетонитрил» и модификатором – 0,2%-й муравьиной кислотой. Метаболиты идентифицировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Для этого интерпретировали спектральные характеристики пиков, которые появились на хроматограммах образцов плазмы крови после перорального введения лютеолин-7-гликозида. Концентрацию анализируемых веществ оценивали методом внутреннего стандарта, в качестве которого выступал рутин. Для определения концентрации лютеолина в качестве стандартного образца использовали стандартизованную субстанцию лютеолина, концентрацию остальных метаболитов оценивали в пересчете на лютеолин.

Результаты и обсуждение. Удалось установить, что после перорального введения лабораторным животным лютеолин-7-гликозида в крахмальном клейстере нативный лютеолин-7-гликозид в плазме крови не обнаруживается. Основными метаболитами являлись лютеолин-диглюкуронид и лютеолин-глюкуронид, их максимальные концентрации в плазме почти в три раза выше, чем концентрации лютеолина и метиллютеолина-диглюкуронида. Результаты сопоставлены с данными других исследований.

Заключение. Отсутствие в плазме крови нативного лютеолин-7-гликозида после перорального введения требует пересмотра адекватности выводов, полученных при исследованиях его активности в опытах *in vitro*. Вместе с тем наличие противовирусной активности *in vivo* обуславливает необходимость проведения дальнейших исследований для установления реальных механизмов действия данной лекарственной субстанции.

Ключевые слова: лютеолин-7-гликозид, метаболизм, флавоноиды, биодоступность

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Г. В. Адамов – ВЭЖХ-анализ, валидация методики количественного анализа, составление дизайна исследования, интерпретация результатов. О. Л. Сайбель – руководитель проекта. А. Н. Бабенко – работа с лабораторными животными, и биологическими жидкостями. Е. С. Мельников – ВЭЖХ-МС анализ, валидация методики количественного анализа. А. И. Радимич – получение субстанции лютеолин-7-гликозида. О. Ю. Куляк – интерпретация результатов исследования. Л. В. Крепкова – организация работы с лабораторными животными.

Финансирование. Данная работа проведена согласно плану научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР по теме: «Фитохимическое обоснование ресурсосберегающих технологий переработки лекарственного растительного сырья и рационального использования биологически активных веществ растительного происхождения» (FGUU-2022-0011).

Для цитирования: Адамов Г. В., Сайбель О. Л., Бабенко А. Н., Мельников Е. С., Радимич А. И., Куляк О. Ю., Крепкова Л. В. Идентификация метаболитов лютеолин-7-гликозида после перорального введения и разработка методики их количественного анализа. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):126–137. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1767>

Identification of luteolin-7-glucoside metabolites after oral administration and development of a method for their quantitative analysis

Grigori V. Adamov¹✉, Olga L. Saybel¹, Alexandra N. Babenko¹, Evgeniy S. Melnikov²,
Andrey I. Radimich¹, Olesya Yu. Kulyak^{1, 3}, Lyubov V. Krepkova¹

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants. 7/1, Grina str., Moscow, 117216, Russia

² I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

³ Lomonosov Moscow State University. 27/1, Lomonosovsky prospect, Moscow, 119192, Russia

✉ **Corresponding author:** Grigoriy V. Adamov. **E-mail:** grig.adamov@mail.ru

ORCID: Grigori V. Adamov – <https://orcid.org/0000-0001-7347-175X>;

Olga L. Saybel – <https://orcid.org/0000-0001-8059-5064>;

Alexandra N. Babenko – <https://orcid.org/0000-0001-9629-5525>;

Evgeniy S. Melnikov – <https://orcid.org/0000-0002-8993-4808>;

Andrey I. Radimich – <https://orcid.org/0000-0002-1139-8902>;

Olesya Yu. Kulyak – <https://orcid.org/0000-0003-0385-3474>;

Lyubov V. Krepkova – <https://orcid.org/0000-0002-3580-336X>.

Received: 07.05.2024

Accepted: 09.08.2024

Published: 09.08.2024

Abstract

Introduction. The development and registration of antiviral drugs is an urgent task. Flavonoids, in particular, luteolin-7-glycoside (cinaroside, luteolin-7-O-glycoside) demonstrate high broad-spectrum antiviral activity *in vitro*, and the industrial regulations for the production of luteolin-7-glycoside from the leaves of holly willow have already been developed at the VILAR. One of the problems with the introduction of flavonoids into medical practice is their low bioavailability and intensive biotransformation. Existing publications provide contradictory data on the pharmacokinetics of luteolin-7-glycoside, and therefore our own research was conducted.

Aim. To develop a methodology for the quantitative analysis of luteolin-7-glycoside and its metabolites in blood plasma and to test it on laboratory animals.

Materials and methods. Animal experiments were carried out in accordance with the requirements of the "Guidelines for conducting preclinical studies of medicines". To develop a method of analysis and further clarify the time intervals of blood sampling, time points were analyzed: 30, 60 minutes, 2, 4, 8, 24 hours after administration of the test substance. Tubes with citrate blood of laboratory animals were centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes. The plasma was placed in an Eppendorf-type test tube, frozen and stored at –20 °C until chromatographic analysis was performed. Blood plasma sample preparation was carried out by precipitation with methyl alcohol, the supernatant was chromatographically separated on a column Luna® 5 µm C18 column 100 Å 250 × 4.6 mm in a gradient mode in a water-acetonitrile system and a modifier – 0.2 % formic acid. The metabolites were identified by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. To do this, the spectral characteristics of the peaks that appeared on the chromatograms of blood plasma samples after oral administration of luteolin-7-glycoside were interpreted. The concentration of the analyzed substances was assessed by the

internal standard method, which was rutin. To determine the concentration of luteolin, a standardized luteolin substance was used as a standard sample, the concentration of the remaining metabolites was estimated in terms of luteolin.

Results and discussion. It was found that after oral administration of luteolin-7-glycoside in starch paste to laboratory animals, native luteolin-7-glycoside was not detected in blood plasma. The main metabolites were luteolin-diglucuronide and luteolin-glucuronide, their maximum plasma concentrations are about three times higher than luteolin and methyllyuteolin-diglucuronide. The results are compared with data from other studies.

Conclusion. The absence of native luteolin-7-glycoside in blood plasma after oral administration makes it necessary to seriously reconsider the relevance of the conclusions obtained during studies of its activity *in vitro*. However, in the presence of antiviral activity *in vivo*, there is an urgent need for further research to establish the real mechanisms of action of this medicinal substance.

Keywords: luteolin-7-glucoside, metabolism, flavonoids, bioavailability

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Grigori V. Adamov – HPLC analysis, validation of the quantitative analysis method, development of the study design, interpretation of the results. Olga L. Saibel – project manager. Alexandra N. Babenko – work with laboratory animals and biological fluids. Evgeniy S. Melnikov – HPLC-MS analysis, validation of the quantitative analysis method. Andrey I. Radimich – obtaining the luteolin-7-glycoside substance. Olesya Yu. Kulyak – interpretation of the study results. Lyubov V. Krepkova – organization of work with laboratory animals.

Acknowledgment. This work was carried out in accordance with the research plan of the Federal State Budgetary Scientific Institution VILAR on the topic: "Phytochemical substantiation of resource-saving technologies for the processing of medicinal plant raw materials and the rational use of biologically active substances of plant origin" (FGUU-2022-0011).

For citation: Adamov G. V., Saybel O. L., Babenko A. N., Melnikov E. S., Radimich A. I., Kulyak O. Yu., Krepkova L. V. Identification of luteolin-7-glucoside metabolites after oral administration and development of a method for their quantitative analysis. *Drug development & registration*. 2024;13(3):126–137. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1767>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время имеется запрос на эффективные, доступные и нетоксичные противовирусные препараты. Этим критериям отвечают некоторые растительные препараты на основе флавоноидов. Для внедрения во врачебную практику данных препаратов необходимо строгое соблюдение принципов доказательной медицины, понимание механизмов действия, фармакокинетики, лекарственных взаимодействий, проведение доклинических и клинических исследований. Флавоноиды как лекарства отличаются безопасностью, поскольку регулярно поступают в организм с растительной пищей и пищеварительная система приспособлена к расщеплению данных ксенобиотиков. Большое количество успешных экспериментов *in vitro* и *in vivo* касательно противовирусной активности флавоноидов, и в частности лутеолина и его производных, подчеркивает целесообразность дальнейших исследований [1-21, 5, 7, 9–14].

Перспективным в этом отношении флавоноидом является лутеолин и его производное – лутеолин-7-глюкозид (ЛГ). Опубликованные данные указывают

на высокую противовирусную активность лутеолина *in vivo* [15] и *in vitro* в клетках человека [4].

В ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» разработана технология получения субстанции ЛГ из доступного растительного сырья.

В соответствии с требованиями Евразийского экономического союза в качестве одного из этапов разработки нового лекарственного средства обозначена необходимость приведения фармакокинетических и фармакодинамических свойств препарата.

Фармакокинетика флавоноидов представлена в систематических обзорах по этой теме [2]. Однако ввиду влияния микрофлоры кишечника некоторые ключевые положения остаются неясными, а данные характеризуются противоречивостью.

Ряд работ исследователей разных стран указывают на то, что ЛГ и лутеолин обнаруживаются в крови после перорального применения, иные, напротив, указывают, что в крови присутствуют только агликон лутеолин и его конъюгаты [1, 3, 16, 17]. В связи с этим открытым остается вопрос о том, можно ли рассматривать ЛГ как пролекарство и его фармако-

логический эффект в организме человека связывать с активностью его метаболитов? Также встает вопрос о целесообразности применения ЛГ в виде гликозида, или все же эффективнее использовать агликон после предварительного гидролиза для достижения наибольшей эффективности?

Таким образом, целью проведенной работы является изучение биодоступности лютеолин-7-гликозида и идентификация его метаболитов в плазме крови крыс после перорального применения. Для достижения поставленной цели определены следующие задачи: разработать методику количественного определения ЛГ и лютеолина в плазме крови, идентифицировать метаболиты и оценить уровни их концентраций, провести пилотное фармакокинетическое исследование ЛГ на лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ

Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах *Wistar* с массой тела 250–270 г, полученных из питомника ФГБНУ ВИЛАР. Животных содержали по 6 особей в клетке в стандартных условиях вивария при естественном освещении и постоянной температуре (21–23 °C), свободном доступе к воде и гранулированному корму. Эксперимент проводили в осенний период. Лабораторные животные прошли трехнедельный карантин в условиях вивария и клинически были здоровы. Эксперименты на животных проводили согласно требованиям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [8] и с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей¹, также они получили одобрение биоэтической комиссии ФГБНУ ВИЛАР.

Реактивы. Ацетонитрил (марка «HPLC Super Gradient», Macron Fine Chemicals™), метанол (марка «ОСЧ», для градиентной ВЭЖХ, ООО ТД «ХИММЕД», Россия), кислота муравьиная (98,0–100,0 %, Sigma-Aldrich, США). Объект исследования – экспериментальная партия субстанции лютеолин-7-глюкозида, полученная в ФГБНУ ВИЛАР, с содержанием основного вещества по ВЭЖХ 97,4 %. Стандартные образцы рутина (содержание основного вещества по ВЭЖХ 99,1 %) и лютеолина (содержание основного вещества по ВЭЖХ 99,5 %) были получены в ФГБНУ ВИЛАР, перед использованием были высушены до постоянной массы.

¹ Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Страсбург; 18 марта 1986 г. Доступно по: <https://rm.coe.int/168007a6a8>. Ссылка активна на 07.05.2024.

МЕТОДЫ

Подготовка ЛГ и пероральное введение

Лютеолин-7-гликозид вводили крысам внутрижелудочно с помощью металлического зонда натошак (животные не получали корм в течение 8 часов до его введения) в дозе 100 мг/кг в виде суспензии, приготовленной на 1%-м крахмальном геле. Объем вводимой суспензии рассчитывали с учетом массы тела животного. Ввиду большой разницы применяемых доз, указанных в исследованиях других авторов (22,4 мг/кг массы [3], 1000 мг/кг массы [1], 170 мг/кг массы [16], 0,48 мг/кг массы [17]), в настоящем исследовании использовали усредненную дозировку, которая позволит сравнить полученные результаты с литературными данными.

Отбор цельной крови, получение плазмы и консервация

До введения, через 30, 60 мин, 2, 4, 8 и 24 ч после введения исследуемого вещества проводили забор крови из хвостовой вены (для отбора проб в каждой временной точке использовали 1 животное, таким образом в данном пилотном исследовании использовано 7 животных). Отбор крови проводили в стерильные пластиковые пробирки, в которые предварительно добавили 3,2%-й раствор цитрата натрия. Соотношение антикоагулянта и крови в этих пробирках составляло 1 : 9 соответственно. Пробирки с кровью центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Плазму помещали в пробирку типа «эппендорф», замораживали и хранили при температуре –20 °C до проведения хроматографического анализа.

Калибровочные образцы и образцы контроля качества

Стандартные растворы лютеолина в метаноле готовили путем разведения исходного стандартного раствора до концентраций 100, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 20000 нг/мл. Растворы для приготовления образцов контроля качества готовили в концентрациях 100, 300, 6000 и 15000 нг/мл

Для приготовления калибровочных образцов и образцов контроля качества в пластиковую пробирку типа «эппендорф» помещали 80 мкл интактной плазмы крови и 20 мкл стандартного раствора. Концентрация лютеолина в плазме крови для калибровочных образцов составила 20, 100, 200, 500, 1000, 2000, 4000 нг/мл, для образцов контроля качества – 20, 60, 1200 и 3000 нг/мл.

Пробоподготовка плазмы крови

Плазму крови размораживали при комнатной температуре и перемешивали. Пробоподготовку проводили методом осаждения белков плазмы крови метанолом. В исследовании по идентификации метаболитов ЛГ к 100 мкл плазмы крови прибавляли

200 мкл метанола, в исследовании с целью количественного определения ЛГ и его метаболитов к 100 мкл испытуемой плазмы крови, калибровочного образца или образца контроля качества прибавляли 200 мкл раствора внутреннего стандарта (раствор рутина в метаноле 3000 нг/мл). Суспензию перемешивали в течение 30 с и центрифугировали 15 мин при 14000 об/мин, супернатант переносили в вials и хроматографировали.

Проведение анализа

Определение концентрации лутеолина в плазме крови крыс проводили на жидкостном хроматографе Prominence-i LC-2030C 3D с УФ-детектором (Shimadzu Corporation Япония), колонке Luna® C18 100 Å, 250 × 4,6 мм, 5 мкм. Элюирование в градиентном режиме, подвижная фаза А – 0,2%-й раствор муравьиной кислоты в воде, В – 0,2%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Объемная доля компонента В изменялась согласно программе: 0 мин – 16 %, 14 мин – 18 %, 40 мин – 50 %, 41 мин – 98 %, 45 мин – 98 %, 46 мин – 16 %, 50 мин – остановка программы. Колонку термостатировали при температуре 26 °С, объем вводимой пробы – 80 мкл. Хроматограмма регистрировалась при длине волны 350 нм. Расчет концентрации проводили методом внутреннего стандарта.

Идентификацию метаболитов лутеолин-7-гликозида проводили на хроматографе LC-30 Nexera с МС/МС-детектором LCMS-8040 (Shimadzu Corporation Япония) при тех же хроматографических условиях. Масс-спектры регистрировали в режиме сканирования полного ионного тока при положительной и отрицательной ионизации методом электрораспыления.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация метаболитов ЛГ

Для идентификации метаболитов ЛГ, циркулирующих в крови крыс, образцы плазмы после осаждения метанолом анализировали с использованием ВЭЖХ-УФ-МС. В результате чего получены хроматограммы при длине волны 350 нм и зарегистрированы масс-спектры.

В ходе исследования путем сравнения хроматограмм при длине волны 350 нм для образцов до и после введения ЛГ крысам определены пики, соответствующие метаболитам ЛГ. Затем проводили интерпретацию масс-спектров, зарегистрированных при временах удерживания, соответствующих пикам на УФ-хроматограммах при длине волны 350 нм, которые отсутствовали на хроматограмме холостого образца и появились после введения ЛГ. Типичная хроматограмма плазмы крови при определении концентрации ЛГ и его метаболитов приведена на рисунке 1, масс-спектры метаболитов на соответствующих временах удерживания на хроматограмме при идентификации метаболитов представлены на рисунке 2.

В условиях мягкой ионизации электроспрея масс-анализатора Shimadzu LCMS-8040 при положительной ионизации в основном характерно протонирование, а при отрицательной – депротонирование. Исходя из полученных результатов, можно сделать выводы, что молекулярные массы соединений составляют 638 (R_t – 22,3 мин), 652 (R_t – 23,6 мин) и 462 (R_t – 28,0 мин), что соответствует лутеолин-диглюкурониду, метил-лутеолин-диглюкурониду и

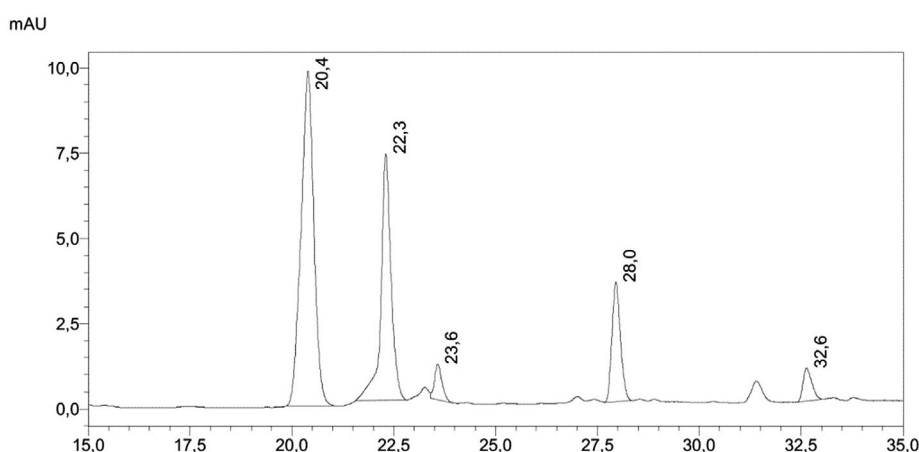


Рисунок 1. Хроматограмма плазмы крови крысы во временной точке 1 ч:

R_t = 20,4 мин – внутренний стандарт рутин; R_t = 22,3 мин – лутеолин-диглюкуронид; R_t = 23,6 мин – метиллутеолин-диглюкуронид; R_t = 28,0 мин – лутеолин-глюкуронид; R_t = 32,6 мин – лутеолин

Figure 1. Chromatogram of rat blood plasma at a time point of 1 hour:

R_t = 20.4 min – internal standard rutin; R_t = 22.3 min – luteolin-diglucuronide; R_t = 23.6 min – methyl luteolin-diglucuronide; R_t = 28.0 min – luteolin-glucuronide; R_t = 32.6 min – luteolin

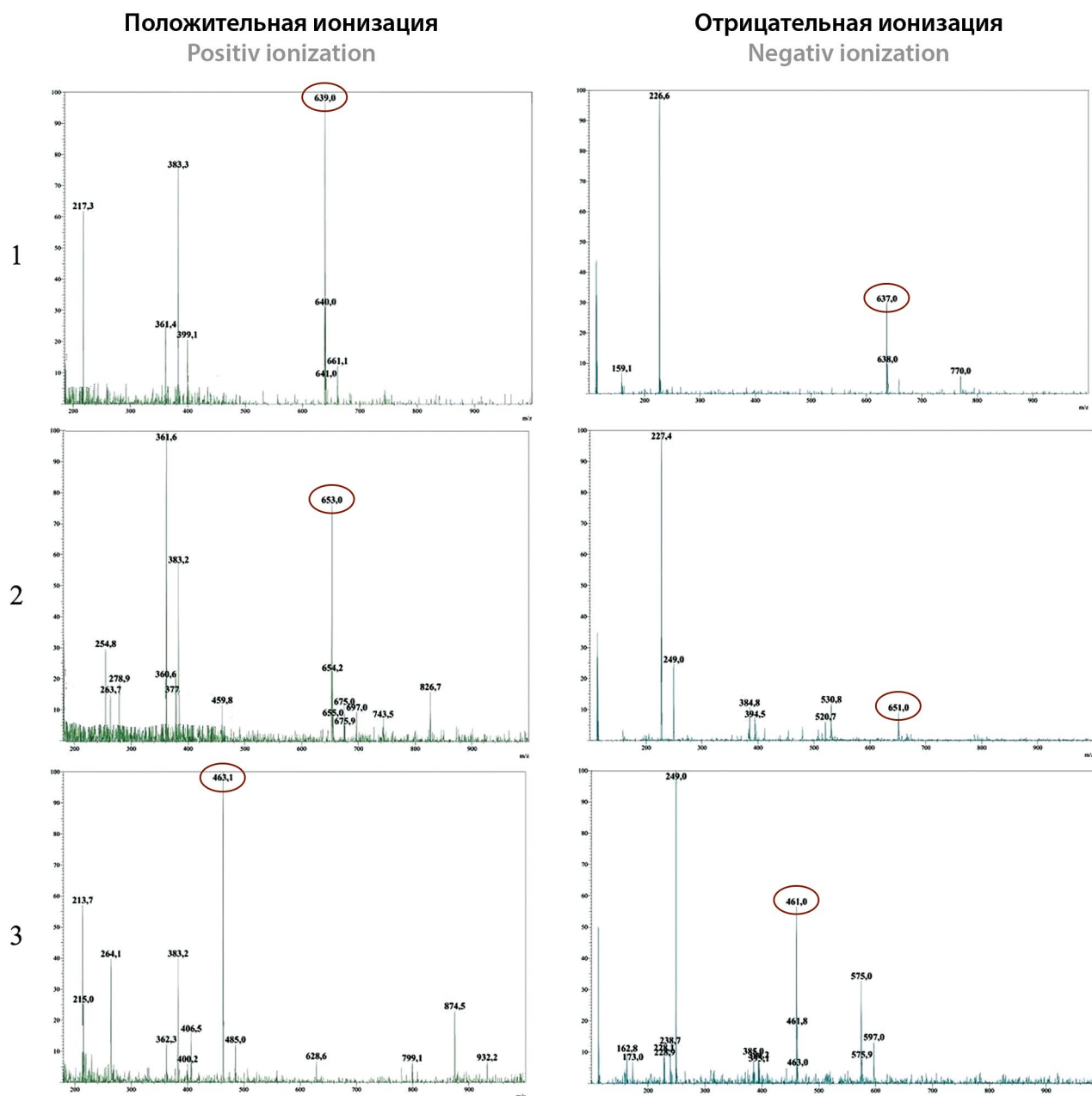


Рисунок 2. МС-спектры соединений:

1 – Rt = 22,3 мин – лютеолин-диглюкуронид; 2 – Rt = 23,6 мин – метиллютеолин-диглюкуронид; 3 – Rt = 28,0 мин – лютеолин-глюкуронид

Figure 2. MS spectra of compounds:

1 – Rt = 22.3 min – luteolin-diglucuronide; 2 – Rt = 23.6 min – methylluteolin-diglucuronide; 3 – Rt = 28.0 min – luteolin-glucuronide

лютеолин-глюкурониду соответственно. Лютеолин был идентифицирован по времени удерживания (Rt – 32,6 мин).

В рамках данного исследования ни с использованием ВЭЖХ-УФ, ни с помощью ВЭЖХ-МС не удалось подтвердить присутствие ЛГ в плазме крови в нативном состоянии, несмотря на то, что некото-

рые существующие исследования [1] описывают динамику изменения концентрации ЛГ в плазме крови крыс после перорального приема. Вероятнее всего, лютеолин-диглюкуронид был ошибочно интерпретирован как ЛГ, так как оба эти соединения имеют схожее хроматографическое поведение и УФ-спектр.

Количественный анализ

Для обоснования возможности применения методики определения лутеолина в плазме крови крыс была проведена ее валидация по параметрам «селективность и специфичность», «нижний предел количественного определения» (НПКО), «аналитический диапазон», «линейность», «правильность и прецизионность», «перенос пробы», «стабильность». Ввиду того, что в испытуемых образцах содержание ЛГ находится ниже предела детектирования, валидация методики проводилась только для лутеолина.

Селективность и специфичность методики доказана отсутствием на хроматограммах образцов интактной плазмы крови пиков с временами удерживания лутеолина, ЛГ и рутина. На хроматограмме образцов контроля качества разрешение между пиками аналитов и ближайших эндогенных веществ составляло более 3,1. При анализе образцов плазмы крови после введения ЛГ было выявлено, что метаболит лутеолин-диглюкуронид имеет время удерживания около 22,3 мин, а исходный ЛГ – 22,0 мин и полного разделения данных веществ не наблюдается. Однако с помощью ВЭЖХ-МС установлено, что в образцах плазмы крови после введения ЛГ при времени удерживания ЛГ не регистрируются масс-спектры, характерные для данного вещества. Таким образом, нативный ЛГ не обнаруживается в плазме крови после перорального приема и не затрудняет определение лутеолин-диглюкуронида.

Аналитический диапазон и линейность методики подтверждены в области концентраций лутеолина в плазме крови 20–4000 нг/мл. Коэффициент корреляции был не менее 0,99, пример калибровочного графика представлен на рисунке 3. Соотношение

«введено/найдено» для калибровочных образцов находили в диапазоне 91–103 %, среднее значение составляло 95,6 %.

Правильность и прецизионность оценивали при анализе образцов контроля качества (по пять образцов для каждого из четырех уровней концентрации) в рамках одного цикла и трех циклов, проанализированных в разные дни. Максимальное отклонение измеренной концентрации от номинальной составило 9,7 %, относительное стандартное отклонение среднего результата не превышало 7,2 %.

НПКО оценивали по соотношению «сигнал/шум». Уровень шума составлял для образцов интактной плазмы крови $2 \cdot 10^{-5}$ В. В точке НПКО, которая составляла 20 нг/мл, высота пика лутеолина – $6 \cdot 10^{-4}$ В. Таким образом, в точке НПКО соотношение «сигнал/шум» превышало 20/1.

При введении образца интактной плазмы после анализа калибровочного образца с концентрацией 4000 нг/мл пик лутеолина на хроматограмме не обнаруживали, что доказывает отсутствие переноса пробы.

Стабильность образцов после пробоподготовки оценивали путем анализа одной и той же пробы после 8 часов хранения в автоматическом пробоотборнике прибора относительно свежеприготовленных калибровочных образцов, разница не превышала 7,5 %. Стабильность лутеолина в плазме крови в условиях заморозки при -20°C подтверждена в течение 60 дней. Различие измеренной концентрации в начале и в конце периода хранения составило не более 5,3 %.

Разработанную и валидированную методику применяли для определения концентрации лутеолина в плазме крови крыс после перорального введе-

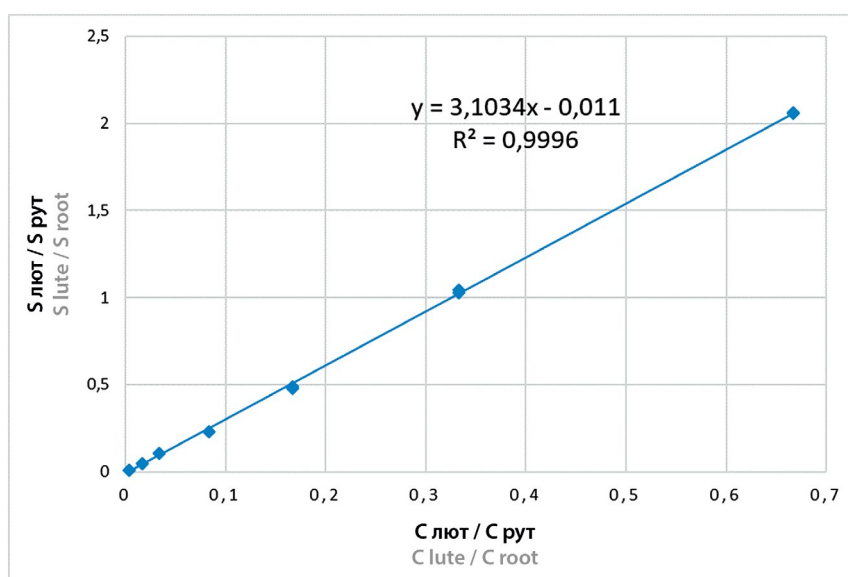


Рисунок 3. Калибровочная кривая для расчета концентрации лутеолина в плазме крови лабораторных животных

Figure 3. Calibration curve for calculating the concentration of luteolin in the blood plasma of laboratory animals

ния ЛГ. Результаты представлены графически на рисунке 4. В точке 0,5 ч концентрация лутеолина все еще находилась на уровне ниже НПКО. Максимальная концентрация зафиксирована в точке 1 ч, второй максимум – в точке 8 ч после введения, за 24 ч лутеолин полностью выводился из организма. Наличие второго максимума концентрации лутеолина требует подтверждения с использованием большего числа лабораторных животных, результаты могут быть ошибочно интерпретированы из-за вариативности между животными. Так, исследование [1] демонстрирует, что в интервале 2–8 ч после внутрижелудочного введения для лутеолина наблюдается плато фармакокинетической кривой.

Одновременно с изучением фармакокинетики лутеолина были получены площади пиков идентифицированных метаболитов. Без стандартных образцов метаболитов не представляется возможным валидировать методику количественного определения и оценить концентрации метаболитов в плазме крови крыс. Однако, учитывая, что углеводная часть гликозидов и глюкуронидов не имеет хромофорных групп, молярные экстинкции этих соединений будут близки с агликонами, соответственно, зависимости отклика УФ-детектора от молярной концентрации флавоноидов и их метаболитов будут тоже близки. Так, согласно Т. Mabry с соавт. [6] молярная экстинкция в максимуме поглощения 22 исследованных флавонов различной структуры варьирует не более чем на 15,3 %.

С данным допущением мы построили фармакокинетические кривые для метаболитов ЛГ (рисунок 5). Полученные результаты доказывают, что основными метаболитами ЛГ после перорального приема у крыс являются диглюкуронид и моноглюкуронид лутеолина. Их максимальные концентрации выше, чем концентрации лутеолина, в 3,6 и 2,7 раза соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, впервые в рамках пилотного исследования на 7 лабораторных животных оценены уровни концентраций четырех метаболитов ЛГ. Максимальная концентрация в плазме крови для лутеолина достигалась к 1 часу, для остальных метаболитов – к 2 часам. К 8 часам концентрации метаболитов в плазме крови крыс находились все еще на высоком уровне. В связи с этим в рамках дальнейшего исследования будет увеличена частота отбора в районе максимальной концентрации и добавлены точки отбора после 8 часов.

Опубликованные ранее исследования сосредоточены на измерении концентрации ЛГ и лутеолина (таблица 1). Однако описаны и другие исследования, приводящие фармакокинетические кривые нативного ЛГ [1, 16, 17], а также работы, доказывающие невозможность его всасывания в виде гликозида [3]. Так, описано исследование, в котором лутеолин-7-гликозид (ЛГ) растворяли в диметилсульфоксиде и

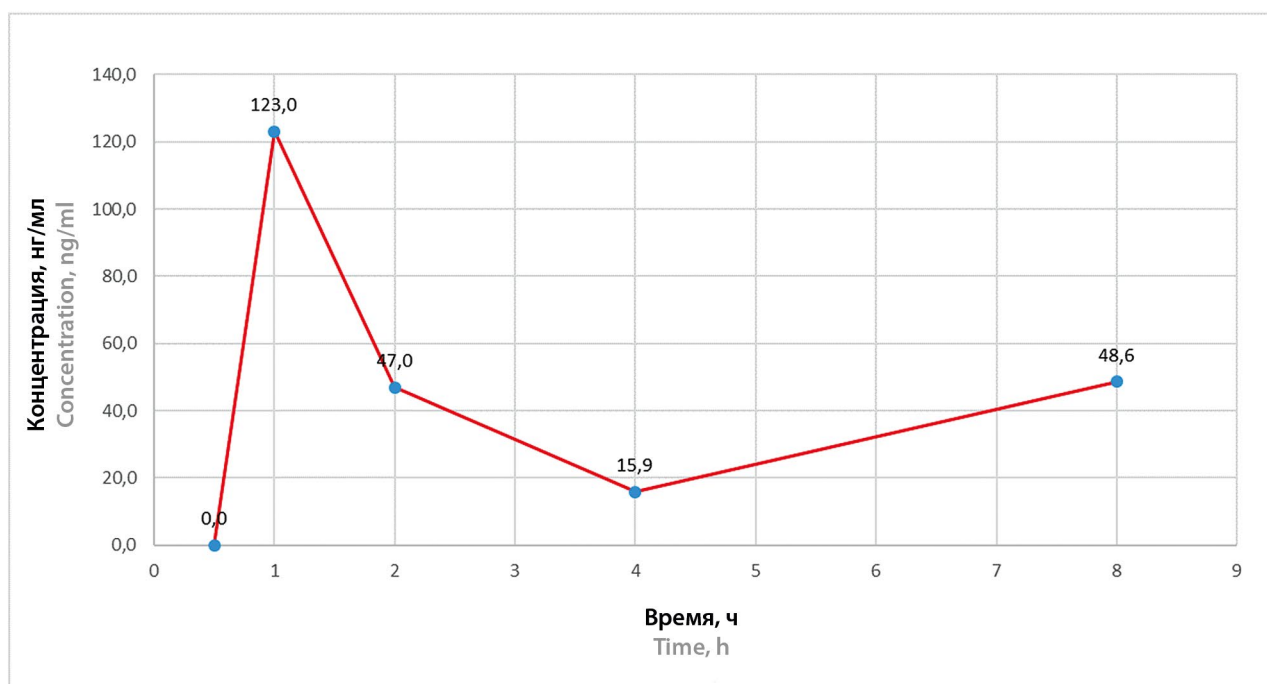


Рисунок 4. Кривая зависимости массовой концентрации лутеолина в плазме крови от времени после однократного введения 100 мг/кг лутеолин-7-гликозида на 1 кг массы лабораторных животных

Figure 4. Curve of the dependence of the mass concentration of luteolin in blood plasma on time after a single administration of 100 mg/kg luteolin-7-glucoside per kg body weight of laboratory animals

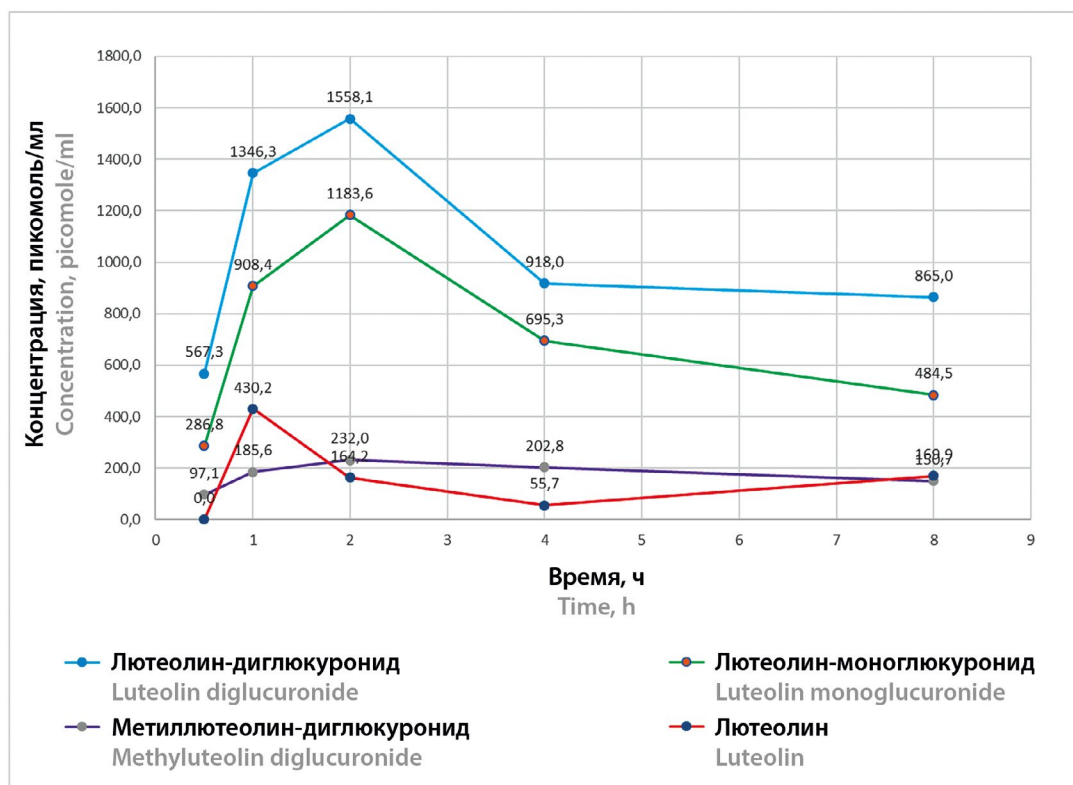


Рисунок 5. Кривая зависимости молярной концентрации от времени лутеолин-диглюкуронида, метиллутеолин-диглюкуронида, лутеолин-глюкуронида и лутеолина в плазме крови после однократного введения 100 мг лутеолин-7-глюкозида на 1 кг массы лабораторных животных

Figure 5. Molar concentration versus time curve of luteolin-diglucuronide, methyluteolin-diglucuronide, luteolin-glucuronide and luteolin in blood plasma after a single administration of 100 mg of luteolin-7-glucoside per kg of laboratory animals

изучали фармакокинетические кривые нативного ЛГ и его агликаона – лутеолина. [1]. В другом показано, что основным метаболитом является моноглюкуронид лутеолина, образующийся в энтероцитах кишечника, в крови также идентифицированы глюкурониды диосметина и нативный лутеолин. В работе [3] и настоящем исследовании животным вводили суспензию ЛГ, после чего ЛГ не обнаруживался в крови в нативной форме. Выводятся флавоны преимущественно с мочой, в обзоре [2] проводится эксперимент с меченым апигенином, структурно близким к лутеолину, показано, что 51 % его выводится с мочой, 12 % – с фекалиями. Конъюгаты флавоноидов, выделяемые в желчь, могут гидролизироваться кишечными бактериями до агликонов, которые содержат β -глюкуронидазу и арилсульфатазу, чем может быть обусловлено наличие второго максимума концентрации агликаона [1]. В эксперименте [21] по изучению метаболизма лутеолина метаболиты лутеолина обнаружены в желчи и предположена энтерогепатическая циркуляция.

Отдельно стоит рассмотреть исследования, в которых изучена биодоступность ЛГ в составе растительных экстрактов [16, 17]. В данных исследованиях

указано, что ЛГ может достигать кровотока. Если данные верны, вероятнее всего, биодоступность ЛГ тесным образом связана с сопутствующими компонентами при р.о. введении. ЛГ практически нерастворим в воде, растворим в диметилсульфоксиде [1], в составе суммарного экстракта ЛГ и другие флавоноиды переходят в раствор из-за взаимного увеличения растворимости родственных веществ и оказывают фармацевтический эффект [18, 19, 20]. В исследовании [3] и настоящем исследовании животным вводили суспензию ЛГ, после чего ЛГ не обнаруживался в крови в нативной форме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках проведенного исследования установлен состав метаболитов после введения крысам суспензии ЛГ в крахмальном клейстере, разработана и валидирована методика количественного определения лутеолина в плазме крови крыс, проведена предварительная оценка концентраций метаболитов

Таблица 1. Результаты изучения фармакокинетики ЛГ по данным литературы
Table 1. Results of studying the pharmacokinetics of luteolin-7-glucoside according to literature

Способ введения Method of administration	Результаты Results	Источник References
Р.о. 1 г ЛГ на 1 кг массы животного (растворитель: вода – диметилсульфоксид) R.o. 1 g luteolin-7-glycoside per 1 kg of animal weight (solvent: water – dimethyl sulfoxide)	ЛГ: $C_{\max} = 3,04 \pm 0,76$ мкг/мл $t_{\max} = 290 \pm 94$ мин биодоступность = 10 ± 2 % AUC (Area Under Curve) = 2109 ± 350 мкг · мин/мл Лютеолин: $C_{\max} = 2,45 \pm 0,5$ мкг/мл $t_{\max} = 280 \pm 57$ мин AUC = 1028 ± 253 мкг · мин/мл Luteolin-7-glycoside: $C_{\max} = 3.04 \pm 0.76$ µg/ml $t_{\max} = 290 \pm 94$ min bioavailability = 10 ± 2 % AUC (Area Under Curve) = 2109 ± 350 µg · min/ml Luteolin: $C_{\max} = 2.45 \pm 0.5$ µg/ml $t_{\max} = 280 \pm 57$ min AUC = 1028 ± 253 µg · min/ml	[1]
Анализ абсорбции ЛГ с использованием вывернутого тонкого кишечника крысы Luteolin-7-glycoside absorption assay using inverted rat small intestine	ЛГ: не обнаружено Luteolin-7-glycoside: not detected	[3]
50 мкмоль/кг массы животного (в 0,5%-м растворе натрия карбоксиметилцеллюлозы) 50 µmol/kg animal weight (in 0.5 % sodium carboxymethylcellulose solution)	ЛГ: не обнаружено Luteolin-7-glycoside: not detected	[3]
Р.о. 10 г экстракта цветков хризантемы (ЛГ 1,71 %) на 1 кг массы животного R.o. 10 g of chrysanthemum flower extract (luteolin-7-glycoside 1.71 %) per 1 kg of animal weight	ЛГ: $C_{\max} = 2,55 \pm 1,12$ мкг/мл $t_{\max} = 6,38 \pm 3,80$ ч Luteolin-7-glycoside: $C_{\max} = 2.55 \pm 1.12$ µg/ml $t_{\max} = 6.38 \pm 3.80$ h	[16]
Р.о. 4 г экстракта корневищ <i>Aglaomorpha fortunei</i> (ЛГ 0,012 %) на 1 кг массы животного R.o. 4 g of <i>Aglaomorpha fortunei</i> rhizome extract (luteolin-7-glycoside 0.012 %) per 1 kg of animal weight	ЛГ: AUC (0–∞) = $565,98 \pm 56,06$ нг · ч/мл $T_{\max} = 1$ ч $C_{\max} = 440,37 \pm 52,16$ мкг/мл Luteolin-7-glycoside: AUC (0–∞) = 565.98 ± 56.06 ng · h/ml $T_{\max} = 1$ h $C_{\max} = 440.37 \pm 52.16$ µg/ml	[17]

литов. В рамках пилотного исследования определены некоторые фармакокинетические параметры, что позволит минимизировать количество лабораторных животных при последующих экспериментах. Удалось установить, что после перорального введения ЛГ лабораторным животным нативный ЛГ в плазме крови не обнаруживается, а метаболитами являются лютеолин-диглюкуронид и лютеолин-глю-

куронид, их максимальные концентрации в плазме почти в три раза выше, чем концентрации лютеолина и метиллютеолина-диглюкуронида. Разработанные методики и полученные предварительные фармакокинетические кривые будут использованы для разработки дизайна дальнейших фармакокинетических исследований с необходимым количеством повторности и временных точек отбора крови.

В дальнейших фармакодинамических исследованиях субстанции ЛГ целесообразно изучение метаболитов: лутеолина агликона, лутеолин-диглюкуро-нида, лутеолин-глюкуроида и метиллутеолина-ди-глюкуроида.

ЛИТЕРАТУРА

- Lin L.-C., Pai Y.-F., Tsai T.-H. Isolation of luteolin and luteolin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and their pharmacokinetics in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015;63(35):7700–7706. DOI: 10.1021/jf505848z.
- Макарова М. Н. Биодоступность и метаболизм флавоноидов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2011;74(6):33–40. DOI: 10.30906/0869-2092-2011-74-6-33-40.
- Shimoi K., Okada H., Furugori M., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Yu., Yamamoto H., Kinase N. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans. *FEBS letters*. 1998;438(3):220–224. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)01304-0.
- Cui X. X., Yang X., Wang H.-J., Rong X.-Y., Jing S., Xie Y.-H., Huang D.-F., Zhao C. Luteolin-7-O-glucoside present in lettuce extracts inhibits hepatitis B surface antigen production and viral replication by human hepatoma cells in vitro. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2425. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02425.
- Caporali S., De Stefano A., Calabrese C., Giovannelli A., Pieri M., Savini I., Tesaro M., Bernardini S., Minieri M., Terri- noni A. Anti-inflammatory and active biological properties of the plant-derived bioactive compounds luteolin and luteolin 7-glucoside. *Nutrients*. 2022;14(6):1155. DOI: 10.3390/nu14061155.
- Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B. The systematic identification of flavonoids. New York: Springer Science & Business Media; 2012. P. 40.
- Быков В. А., Дубинская В. А., Ребров Л. Б., Мине-ева М. Ф., Скуридин С. Г., Евдокимов Ю. М. Комп-лексный подход к изучению механизмов действия противомикробных и противовирусных средств. *Хи-мико-фармацевтический журнал*. 2008;42(3):3–8. DOI: 10.30906/0023-1134-2008-42-3-3-8.
- Миронов А. Н., ред. Руководство по проведению до-клинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012. С. 843–853.
- Theoharides T. C. COVID-19, pulmonary mast cells, cy- tokine storms, and beneficial actions of luteolin. *BioFac- tors*. 2020;46(3):306–308. DOI: 10.1002/biof.1633.
- Fan W., Qian S., Qian P., Li X. Antiviral activity of luteo- lin against Japanese encephalitis virus. *Virus Research*. 2016;220:112–116. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.04.021.
- Theerawatanasirikul S., Thangthamniyom N., Kuo C.-J., Semkum P., Phecharat N., Chankeeree P., Lekcharoensuk P. Natural phytochemicals, luteolin and isoginkgetin, inhibit 3C protease and infection of FMDV, in silico and in vitro. *Viruses*. 2021;13(11):2118. DOI: 10.3390/v13112118.
- Wu S., Wang H.-Q., Guo T.-T., Li Y.-H. Luteolin inhibits CVB3 replication through inhibiting inflammation. *Journal of Asian natural products research*. 2020;22(8):762–773. DOI: 10.1080/10286020.2019.1642329.
- Yan H., Ma L., Wang H., Wu S., Huang H., Gu Z., Jiang J., Li Yu. Luteolin decreases the yield of influenza A virus in vitro by interfering with the coat protein I complex exp-ression. *Journal of Natural Medicines*. 2019;73:487–496. DOI: 10.1007/s11418-019-01287-7.
- Wang S., Ling Y., Yao Yu., Zheng G., Chen W. Luteolin inhi- bits respiratory syncytial virus replication by regulating the MiR-155/SOCS1/STAT1 signaling pathway. *Virology Journal*. 2020;17:187. DOI: 10.1186/s12985-020-01451-6.
- Men X., Li S., Cai X., Fu L., Shao Y., Zhu Y. Antiviral activity of luteolin against Pseudorabies virus in vitro and in vivo. *Animals*. 2023;13(4):761. DOI: 10.3390/ani13040761.
- Jia Q., Huang X., Yao G., Ma W., Shen J., Changm Y., Ouyangm H., He J. Pharmacokinetic Study of Thirteen In- gredients after the Oral Administration of *Flos Chrysanthemi* Extract in Rats by UPLC-MS/MS. *BioMed Research Inter- national*. 2020;2020(1):8420409. DOI: 10.1155/2020/8420409.
- Xu Z.-L., Xu M.-Y., Wang H.-T., Xu Q.-X., Liu M.-Y., Jia C.-P., Geng F., Zhang N. Pharmacokinetics of eight flavo- noids in rats assayed by UPLC-MS/MS after Oral Admi- nistration of *Drynariae rhizoma* extract. *Journal of Ana- lytical Methods in Chemistry*. 2018;2018(1):4789196. DOI: 10.1155/2018/4789196.
- Гуленков А. С., Мизина П. Г., Бахрушина Е. О., Барда- ков А. И., Нюдочкин А. В. Фармацевтико-технологическое исследование адсорбированного жидкого растительно- го экстракта антимикробного действия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):94–101. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-94-101.
- Гуленков А. С., Мизина П. Г. Сорбция и десорбция жид- кого растительного экстракта. *Фармация*. 2019;68(4):27–31. DOI: 10.29296/25419218-2019-04-04.
- Rezaei A., Varshosaz J., Fesharaki M., Farhang A., Jafa- ri S. M. Improving the solubility and in vitro cytotoxicity (anticancer activity) of ferulic acid by loading it into cyc- lodextrin nanosponges. *International Journal of Nanome- dicine*. 2019;14:4589–4599. DOI: 10.2147/IJN.S206350.
- Deng C., Gao C., Tian X., Chao B., Wang F., Zhang Y., Zou J., Liu D. Pharmacokinetics, tissue distribution and excre- tion of luteolin and its major metabolites in rats: Meta- bolites predominate in blood, tissues and are mainly excreted via bile. *Journal of Functional Foods*. 2017;35:332–340. DOI: 10.1016/j.jff.2017.05.056.

REFERENCES

- Lin L.-C., Pai Y.-F., Tsai T.-H. Isolation of luteolin and luteolin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and their pharmacokinetics in rats. *Journal of agri- cultural and food chemistry*. 2015;63(35):7700–7706. DOI: 10.1021/jf505848z.
- Makarova M. N. Bioavailability and metabolism of flavo- noids. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2011;74(6):33–40. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2011-74-6-33-40.
- Shimoi K., Okada H., Furugori M., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Yu., Yamamoto H., Kinase N. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans. *FEBS letters*. 1998;438(3):220–224. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)01304-0.

4. Cui X. X., Yang X., Wang H.-J., Rong X.-Y., Jing S., Xie Y.-H., Huang D.-F., Zhao C. Luteolin-7-O-glucoside present in lettuce extracts inhibits hepatitis B surface antigen production and viral replication by human hepatoma cells in vitro. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2425. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02425.
5. Caporali S., De Stefano A., Calabrese C., Giovannelli A., Pieri M., Savini I., Tesaro M., Bernardini S., Minieri M., Terrinoni A. Anti-inflammatory and active biological properties of the plant-derived bioactive compounds luteolin and luteolin 7-glucoside. *Nutrients*. 2022;14(6):1155. DOI: 10.3390/nu14061155.
6. Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B. The systematic identification of flavonoids. New York: Springer Science & Business Media; 2012. P. 40.
7. Bykov V. A., Dubinskaya V. A., Rebrov L. B., Mineeva M. F., Skuridin S. G., Evdokimov Yu. M. Complex approach to investigation of the mechanisms of antimicrobial and antiviral drug action. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008;42(3):3–8. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2008-42-3-3-8.
8. Mironov A. N., editor. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Moscow: Grif and K; 2012. P. 843–853. (In Russ.).
9. Theoharides T. C. COVID-19, pulmonary mast cells, cytokine storms, and beneficial actions of luteolin. *BioFactors*. 2020;46(3):306–308. DOI: 10.1002/biof.1633.
10. Fan W., Qian S., Qian P., Li X. Antiviral activity of luteolin against Japanese encephalitis virus. *Virus Research*. 2016;220:112–116. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.04.021.
11. Theerawatanasirikul S., Thangthamniyom N., Kuo C.-J., Semkum P., Phecharat N., Chankeeree P., Lekcharoensuk P. Natural phytochemicals, luteolin and isoginkgetin, inhibit 3C protease and infection of FMDV, in silico and in vitro. *Viruses*. 2021;13(11):2118. DOI: 10.3390/v13112118.
12. Wu S., Wang H.-Q., Guo T.-T., Li Y.-H. Luteolin inhibits CVB3 replication through inhibiting inflammation. *Journal of Asian natural products research*. 2020;22(8):762–773. DOI: 10.1080/10286020.2019.1642329.
13. Yan H., Ma L., Wang H., Wu S., Huang H., Gu Z., Jiang J., Li Yu. Luteolin decreases the yield of influenza A virus in vitro by interfering with the coat protein I complex expression. *Journal of Natural Medicines*. 2019;73:487–496. DOI: 10.1007/s11418-019-01287-7.
14. Wang S., Ling Y., Yao Yu., Zheng G., Chen W. Luteolin inhibits respiratory syncytial virus replication by regulating the MiR-155/SOCS1/STAT1 signaling pathway. *Virology Journal*. 2020;17:187. DOI: 10.1186/s12985-020-01451-6.
15. Men X., Li S., Cai X., Fu L., Shao Y., Zhu Y. Antiviral activity of luteolin against Pseudorabies virus in vitro and in vivo. *Animals*. 2023;13(4):761. DOI: 10.3390/ani13040761.
16. Jia Q., Huang X., Yao G., Ma W., Shen J., Changm Y., Ouyangm H., He J. Pharmacokinetic Study of Thirteen Ingredients after the Oral Administration of *Flos Chrysanthemi* Extract in Rats by UPLC-MS/MS. *BioMed Research International*. 2020;2020(1):8420409. DOI: 10.1155/2020/8420409.
17. Xu Z.-L., Xu M.-Y., Wang H.-T., Xu Q.-X., Liu M.-Y., Jia C.-P., Geng F., Zhang N. Pharmacokinetics of eight flavonoids in rats assayed by UPLC-MS/MS after Oral Administration of *Drynariae rhizoma* extract. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2018;2018(1):4789196. DOI: 10.1155/2018/4789196.
18. Gulenkov A. S., Mizina P. G., Bakhrushina E. O., Bardakov A. I., Nyudochkin A. V. Pharmaceutical-technological Study of Adsorbed Liquid Plant Extract of Antimicrobial Activity. *Drug development & registration*. 2022;11(2):94–101. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-94-101.
19. Gulenkov A. S., Mizina P. G. Sorption and desorption of liquid plant extract. *Pharmacy*. 2019;68(4):27–31. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2019-04-04.
20. Rezaei A., Varshosaz J., Fesharaki M., Farhang A., Jafari S. M. Improving the solubility and in vitro cytotoxicity (anticancer activity) of ferulic acid by loading it into cyclodextrin nanosponges. *International Journal of Nanomedicine*. 2019;14:4589–4599. DOI: 10.2147/IJN.S206350.
21. Deng C., Gao C., Tian X., Chao B., Wang F., Zhang Y., Zou J., Liu D. Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion of luteolin and its major metabolites in rats: Metabolites predominate in blood, tissues and are mainly excreted via bile. *Journal of Functional Foods*. 2017;35:332–340. DOI: 10.1016/j.jff.2017.05.056.