

ФАРМАКОКИНЕТИКА РЕТИНОЛА ПАЛЬМИТАТА

Ю.П.Арханчев, К.С.Гузев, А.В.-К.Масюлис

АО "Ретиноиды", ЦКВИ.

При отработке метода определения концентрации в крови ретинола пальмитата были использованы метод обращенно-фазовой хроматографии и метод прямой фазы.

При использовании обращенно-фазовой хроматографии (колонка Ultrasphere ODS-5 мкм, (4,6 x 250 мм) элюирующая система метанол, метанол-вода, ацетонитрил-вода и т.д. Ретинола пальмитат прочно сорбируется на колонке. Это увеличивает время самого анализа (до 30 мин и более) и резко снижает его чувствительность.

При использовании прямой фазы (колонка Ultrasphere - Si-5 мкм, 4,6 x x 250 мм), элюирующая система гексан-изопропиловый спирт, ретинола пальмитат даже при незначительном содержании изопропанола в системе (менее 0,1%) выходит вместе с несорбируемыми компонентами липидного экстракта сыворотки крови, содержание которых значительно выше, чем ретинола пальмитата. Применение 25 см-колонки и высушенного гексана (удаление воды общепринятыми методами) позволило увеличить время удержания ретинола пальмитата до 7 мин и отделить его от остальных компонентов, которые мешают определению.

Экстракцию ретинола пальмитата в плазме крови проводили гексаном, что несколько снижает выход ретинола пальмитата (общий выход - до 80 %), однако при этом в экстракт попадает значительно меньше других компонентов, как правило, мешающих определению ретинола пальмитата.

Окончательный вариант определения ретинола пальмитат состоит в следующем: 0,1 мл сыворотки крови смешивают с 0,3 мл метанола, тщательно перемешивают в течение 5 мин., добавляют 0,7 мл гексана и экстрагируют в течение 10 мин. Центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин, органический слой отбирают и упаривают под азотом. Сухой остаток после упаривания растворяют в 50 мкл смеси гексан-изопропиловый спирт (99,9 : 0,1) и вводят в хроматограф.

Высокоэффективная жидкостная хроматография осуществляется на системе для высокоэффективной жидкостной хроматографии фирмы Altex (США). Колонка Ultrasphere-Si, 5 мкм, (4,6 x 250 мм), элюирующая система гексан-изопропиловый спирт (99,9 : 0,1), детектирование при 325 нм. Чувствительность метода составляет 2 нг при соотношении к сигнал к шуму 1:5.

Исследование влияния факторов внешней среды на устойчивость ретинола пальмитата в сыворотке крови крыс.

Опыты проводились на крысах-самках Вистар массой 180-200 г, которым однократно внутрибрюшинно вводили ретинола пальмитат (28500 МЕ/кг массы тела) в виде масляного раствора. Через 2 часа после легкого эфирного наркоза животных декапитировали, кровь собирали в центрифужные пробирки, отстаивали в течение 30-40 мин, центрифугировали при 1500 об/мин в течение 30 мин и отбирали сыворотку крови. Сыворотку животных 1 группы сразу ставили в холодильник при -20 С, сыворотку животных 2-й группы выдерживали в течение 30 мин в темноте при температуре 20 С в течение 60 мин; животных 4-й и 5-й групп – на свету при температуре 20 С в течение 30 и 60 мин. Затем пробы замораживались.

Количественное определение ретинола пальмитата в сыворотке экспериментальных животных проводилось методом ВЭЖХ. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрация ретинола пальмитата в сыворотке крови крыс М№м, n=7

Группа животных	Концентрация ретинола пальмитата в сыворотке крови (мкг/100 мл)
Контрольная	1,99№0,41
Группа 1	10,61№3,70
Группа 2	9,24№2,00
Группа 3	14,02№1,96
Группа 4	11,17№3,22
Группа 5	7,47№1,23

Полученные результаты свидетельствуют, что при хранении образцов сыворотки на свету при температуре 20 С происходит падение концентрации ретинола пальмитата, за 1 час на 30%.

Определение концентрации ретинола пальмитата в модельных системах.

Опыт 1. Крысам-самкам линии Вистар массой 150-190 г. наносилась 5% мазь ретинола пальмитата (5 г) на выстриженные участки спины площадью 25 кв.см. Через 0,5 - 1 - 2 - 4,5 - 6 - 24 - 48 часов после легкого эфирного наркоза животных декапитировали и проводили

определение концентрации ретинола пальмитата в сыворотке крови, как описано выше. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2. Содержание ретинола пальмитата в крови у крыс после однократного нанесения на кожу мази с витамином А.

Время забора крови после нанесения на кожу мази с витамином А (час)	Концентрация ретинола пальмитата в мкг/мл
0,5	0,51±0,11
1	0,66±0,11
2	4,86±0,63
4,5	3,28±1,22
6	0,65±0,11
24	0,65±0,10

Из таблицы видно, что максимальная концентрация ретинола пальмитата в крови достигается через 2 часа, сохраняется на высоком уровне до 4,5 часа и в дальнейшем снижается до исходного уровня. Эти данные отражают фармакокинетику ретинола пальмитата в крови.

Опыт 2. Условия опыта - такие же, но ретинола пальмитат в виде масляного раствора вводился однократно зондом в желудок, 50 мг на одно животное. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Время забора крови после нанесения на кожу мази с витамином А (час)	Концентрация ретинола пальмитата в мкг/мл
0,5	0,6±0,13
1	5,8±0,8
2	4,6±0,6
4,5	2,1±0,4
6	0,6±0,3
24	0,7±0,4
48	0,5±0,07

Из таблицы видно, что фармакокинетика ретинола пальмитата при внутривенном введении вещества имеет ту же направленность, что и при накожном его нанесении. Однако пик повышения концентрации ретинола пальмитата наступает раньше и раньше снижается.

Опыт 3. Изучено влияние условий хранения образцов крови до определения концентрации ретинола пальмитата у пожилых людей, страдающих климактерическим гиперкератозом (18 человек, по 6 в группе). Взятая из локтевой вены кровь хранилась 6 часов:

- при 20 С в темноте
- при 20 С на свету
- в морозильнике, в темноте, при -20 С.

Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Содержание ретинола пальмитата в крови пожилых людей при разных условиях хранения крови перед исследованием.

Хранение при комнатной температуре в темноте, мкг/мл	Хранение при комнатной температуре на свету, мкг/мл	Хранение в темноте при -20 С, мкг/мл
0,018 № 0,002	0,013 № 0,001	0,35 № 0,01

Полученные данные свидетельствуют, что на свету и при комнатной температуре ретинола пальмитат разрушается. Образцы крови от момента взятия и до начала исследования необходимо хранить в темноте в морозильнике.

Опыт 4. У 5 пациентов-мужчин в возрасте 23-27 лет определена концентрация ретинола пальмитата в крови до и через 1 час после приема мягкой пероральной разъемной желатиновой капсулы, содержащей 300 тыс. МЕ ретинола пальмитата. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Содержание ретинола пальмитата в крови у мужчин в возрасте 23-27 лет до и через 1 час после однократного приема внутрь 300 тыс. МЕ ретинола пальмитата.

Содержание в крови ретинола пальмитата до приема ретинола пальмитата, мкг/мл	Содержание в крови ретинола пальмитата через 1 час после приема ретинола пальмитата, мкг/мл
0,59 № 0,06	0,81 № 0,07

Из таблицы очевидно, что ретинола пальмитат высвобождается из желатиновых капсул и поступает в кровь, повышая его концентрации в единице объема сыворотки.

С учетом результатов исследования 3 (опыты 1 и 2, таблицы 2 и 3) с помощью одночастевой модели, описывающей внемоделное всасывание, были рассчитаны основные фармакокинетические показатели ретинола пальмитата при введении внутрь и парэнтеральном.

На рис. 1 и 2 приведены фармакокинетические кривые ретинола пальмитата в координатах "концентрация-время", построенные по данным компьютерного расчета. Ниже в таблицах 6 и 7 представлены экспериментальные и теоретические концентрации ретинола пальмитата. Из них видно, что фактические и теоретические концентрации лекарственного вещества близки по своим абсолютным значениям. Это может служить основанием для утверждения о правильности выбранной математической модели и достоверности полученных результатов.

Таблица 6. Экспериментальные и теоретические концентрации ретинола пальмитата в крови крыс при введении его внутрь.

Время взятия крови (ч)	Концентрация экспериментальная (мкг/мл)	Концентрация теоритическая (мкг/мл)
0,5	0,600	0,600
1	5,800	5,800
2	4,600	1,835
4	2,100	1,730
6	0,600	1,632
24	0,700	0,964
48	0,500	0,477

Таблица 7. Экспериментальные и теоретические концентрации ретинола пальмитата в крови крыс после однократной аппликации на кожу 5% мази.

Время взятия крови (ч)	Концентрация экспериментальная (мкг/мл)	Концентрация теоритическая (мкг/мл)
0,5	0,510	0,510
1	0,660	0,660
2	0,480	4,860

4	3,280	0,786
6	0,650	0,754
24	0,650	0,454
48	0,190	0,231

Основные фармакокинетические показатели ретинола пальмитата после введения его внутрь представлены в таблице 8.

Таблица 8. Основные фармакокинетические показатели ретинола пальмитата после однократного приема внутрь масляного раствора.

Параметр	Единица измерения	Величина	
Константа элиминации	K_{el}	1/ч	0,0293
Время полувыведения	$T_{1/2}$	ч	23,7
Время полного всасывания	T	ч	2,00
Максимальная концентрация	C_{max}	мкг/мл	5,800
Время наступления	$C_{max} T_{max}$	ч	1,0
Процент введенной дозы	$T-0,5$ ч	%	30,3
Процент введенной дозы	$T-2,0$ ч	%	100,0
Общий клиренс	Cl_t	мл/мин	12,2
Объем распределения		л	25
Площадь под кривой	AUC	мкг/ч/мл	68,2
Относительная биодоступность		%	100

Из таблицы 8 видно, что после приема внутрь ретинола пальмитата быстро, на непродолжительный срок достигается высокое содержание его в крови. Через 0,5 часа всасывается около 30,3% введенной дозы, а через 2 ч - 100%. Максимальная концентрация ретинола пальмитата в крови, равная 5,80 мкг/мл, определяется через 1 час. Выведение ретинола пальмитата из кровяного русла описывается константой элиминации, равной 0,0293; время полувыведения соответствует 23,7 час; совобожжение тест-ткани от препарата соответствует величине общего клиренса, равного 12,2 мл/мин; площадь под кривой "концентрация-время" - 68,2 мкг/ч/мл. Все эти данные свидетельствуют о хорошей

биологической доступности ретинола пальмитата после приема внутрь, а величина площади под кривой "концентрация-время" может служить параметром сравнения с аналогичными величинами при определении относительной биодоступности ретинола пальмитата в других лекарственных формах.

Таблица 9. Основные фармакокинетические показатели ретинола пальмитата после однократной аппликации на кожу 5% мази.

Параметр	Единица измерения	Величина
Константа элиминации	K_{el}	1/ч
Время полувыведения	$T_{1/2}$	ч
Время полного всасывания	T	ч
Максимальная концентрация	C_{max}	мкг/мл
Время наступления	T_{max}	ч
Процент введенной дозы	$T-0,5$ ч	%
Процент введенной дозы	$T-2,0$ ч	%
Процент введенной дозы	$T-4,5$ ч	%
Общий клиренс	Cl_t	мл/мин
Объем распределения		л
Площадь под кривой	AUC	мкг/ч/мл
Относительная биодоступность		%

Данные таблицы 9 показывают, что поступление ретинола пальмитата в кровь через кожу идет медленнее. Так, за 0,5 часа всасывается лишь 47,8% дозы, через 1 час - 62,5%, а полное всасывание ретинола пальмитата осуществляется за 4,5 часа. Максимальная концентрация, равная 4,86 мкг/мл, определяется через 2 часа. Выведение ретинола пальмитата из кровяного русла описывается константой элиминации, равной 0,0282, что совпадает с этим же показателем при введении лекарственного вещества внутрь в виде масляного раствора. Равенство величины времени полувыведения и общего клиренса при различных путях введения препарата свидетельствует об одинаковом пути и механизме метаболизма ретинола пальмитата. Однако, расчет относительной биологической доступности лекарственного препарата на основе их параметра площади под фармакокинетической кривой

"концентрация-время" показал, что после нанесения мази усваивается лишь 55,87% введенной дозы вещества, что свидетельствует о сниженной биодоступности препарата из мази.

Заключение. Сравнительное изучение фармакокинетики ретинола пальмитата при введении его внутрь в виде масляного раствора и нанесении на кожу в виде 5% мази показало, что при первом пути введения обеспечивается более полное и быстрое поступление ретинола пальмитата в кровь, максимальная концентрация достигается за более короткий срок и этот путь введения обладает большей биологической доступностью.