

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА ФОСФОЛИПИДНЫХ
КОМПОНЕНТОВ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ЛИПОФЕРОЛ
С ПРИМЕНЕНИЕМ УСОВЕРШЕНСТВОВАННОГО МЕТОДА ТОНКОСЛОЙНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ**

Шанская А.И., Пучкова С.М., Недачина Н.А., Хмылова Г.А.

*ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и
трансфузиологии ФМБА», Санкт-Петербург, 191024, 2-ая Советская ул., д. 16,*

тел. (812) 274-56-30, E.mail: bloodscience@mail.ru

Резюме: Созданный в ФГБУ РосНИИГТ липосомальный препарат для внутривенного введения Липоферол содержит комплекс высокоочищенных соевых фосфолипидов, идентичных по составу основному классу липидов клеточных мембран. Индивидуальные компоненты применяемого фосфолипидного комплекса фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидилинозитол (ФИ) обладают высокой физиологической толерантностью, легко метаболизируются, активность каждого из них обусловлена специфически направленными функциональными свойствами. В работе представлены данные по оптимальному количественному соотношению основных мембраностабилизирующих фракций фосфолипидов субстанций липосомального препарата Липоферол «Лецитин соевый 10% спиртовой раствор» и «Фосфолипиды кислые соевые», полученные усовершенствованным методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с применением отечественных промышленных пластин Сорбфил и оборудования для высокоэффективной ТСХ (денситометр Ден Скан с программой «DENS» для Windows). Программное обеспечение позволяет обрабатывать любое введенное изображение хроматограмм и выдавать на экран результаты анализа.

Ключевые слова: фосфолипиды, тонкослойная хроматография, фракционный состав, денситометр, липосомальный препарат.

**STUDY OF THE FRACTIONAL COMPOSITION OF THE PHOSPHOLIPID
COMPONENTS OF THE LIPOSOMAL DRUG LIPOFEROL USING IMPROVED BY
THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY**

Shanskaja A.I., Puchkoya S.M., Nedachina N.A., Khmylova G.A.

*Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology (RRIHT), St.-Petersburg, 191024,
2nd Sovetskaya str., 16*

Summary: Created in RRIHT liposomal drug for intravenous infusion Lipoferol contains a complex of highly purified soybean phospholipids, identical in composition to the main class of cell membrane lipids. The individual components used phospholipid complex phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (pea), phosphatidylinositol (PI) have a high physiological tolerance, easy metabolizers, the activity of each of them is caused specifically aimed functional properties. The paper presents data on the optimal quantitative ratio of basic membrane fractions of phospholipids substances liposomal drug Lipoferol “Lecithin Soy, a solution of 10% alcohol” and “Phospholipids Sour Soy” received improved thin-layer chromatography (TLC) using domestic industrial plates Sorbfil and equipment for high-performance TLC (densitometer Den Scan with the program "DENS" for Windows). The software allows to process any captured image chromatograms and give analysis results on the screen.

Keywords: phospholipids, thin layer chromatography, fractional composition, densitometer, liposomal drug.

Введение

В настоящее время развитие науки и технологии позволяет, наряду с поиском путей получения новых лекарственных средств, совершенствовать лекарственные формы уже имеющихся препаратов с целью снижения частоты и степени побочных реакций. Одним из таких способов совершенствования является создание липидсодержащих систем — липосом.

Для получения липосомальных лекарственных препаратов широкое применение находят формирующие бислои фосфолипиды (ФЛ), идентичные по составу основному классу липидов клеточных мембран. ФЛ, являясь структурными элементами всех существующих в природе организмов, представляют собой комплекс химических веществ, относящихся к полярным липидам. Каждый индивидуальный компонент фосфолипидного комплекса обладает уникальной физиологической активностью со специфически направленными функциональными свойствами. Фосфатидилхолин (ФХ), максимально представленный в мембранах различных клеток и тканей (35-50% от всех ФЛ), мажорный, метаболически важный фосфолипид фосфатидилэтаноламин (ФЭА) и фосфатидилинозит (ФИ), относящийся к минорным, метаболически значимым, анионным фосфолипидам.

Наличие в молекулах ФЛ гидрофильной части – фосфорилированного спирта («полярная головка») и липофильной части – радикалов жирных кислот («жирнокислотный хвост») обуславливает амфифильность ФЛ и такое их уникальное свойство, как способность к эмульгированию в водных системах с образованием при определенных условиях мембранных структур (ламелл, липосом, мицелл). Именно это свойство ФЛ взято природой в качестве основы для конструирования всех без исключения клеточных мембран как растительного, так и животного происхождения. Оно же, после специального подбора условий, позволяет применять ФЛ в качестве поверхностно-активного вещества (сурфактанта) при получении эмульсий и наночастиц (липосом, мицелл), используемых для доставки лекарственных соединений и биологически активных веществ в клетки [1].

В мировой практике производства липосомальных лекарственных препаратов фосфолипидной основой чаще всего являются ФЛ сои – культуры, которая остается непревзойденным источником полиненасыщенных ФЛ, благодаря входящим в состав их молекул радикалов ω -6 и ω -3 жирных кислот (линолевой и линоленовой), которые не синтезируются в организме человека и относятся к категории незаменимых (эссенциальных) жирных кислот.

Наличие в составе фосфолипидных комплексов эссенциальных ФЛ значительно расширяет их функциональные возможности, основными из которых являются:

1. восстанавливающая и гепатопротективная: ФЛ «встраиваются» в мембраны клеток

печени, «латая» образовавшиеся в них дефекты и восстанавливая нормальную работу гепатоцитов;

2. антифибротическая: в результате восстановления целостности мембран прекращается развитие фиброза (формирования соединительной ткани);
3. антиоксидантная: ФЛ, содержащие в своем составе полиненасыщенные жирные кислоты, легко устанавливают связи со свободными радикалами и тем самым становятся для них своеобразной ловушкой [2].

Выгодным отличием сои от других масличных культур является значительно более высокое содержание основных мембранообразующих фосфолипидных фракций (ФХ, ФЭА, ФИ).

Нами при разработке способа получения липосомального препарата предпочтение также было отдано соевым ФЛ.

Цель исследования

Растительные ФЛ, включая соевые, представляют собой сложные многокомпонентные липидные комплексы, групповой состав которых широко варьируется в зависимости от источника, условий выделения и способов фракционирования. Молекулы ФЛ имеют близкое строение, сопоставимую полярность, склонность к полиморфизму. Как следствие этого, при анализе различных фосфолипидных смесей крайне затруднены процедуры разделения, идентификации, а значит и количественная оценка содержания отдельных компонентов (индивидуальных ФЛ). Поэтому целью настоящего исследования являлось усовершенствование уже давно применяемого в нашей практике метода ТСХ, который обеспечивал бы получение достоверных данных о составе фосфолипидных субстанций препарата Липоферол.

Материалы и методы

Существующие в настоящее время автоматизированные методы определения качественного и количественного состава ФЛ, требующие дорогостоящего приборного оформления, не всегда гарантируют получение воспроизводимых и достоверных результатов. Поэтому многие исследователи продолжают отдавать предпочтение методу ТСХ, который в сочетании с современными программными средствами визуализации (денситометр Ден Скан с программой «DENS» для Windows) дает возможность быстро и с наименьшими затратами определять состав фосфолипидных препаратов [3].

Программное обеспечение в данном случае позволяет обрабатывать любую введенную хроматограмму в течение 5 минут и выдавать на экран результаты анализа в форме, содержащей описание условий эксперимента, плутоновое монохромное изображение рабочей области хроматограммы, таблицы результатов (значения R_f , процентное содержание каждого компонента, процентное содержание площадей каждого компонента, количество анализируемых веществ) и калибровочную зависимость с указанием метода ее построения.

В лаборатории жировых эмульсий РосНИИГТ разработана технология получения из соевого сырья фосфолипидных субстанций препарата Липоферол – лецитин соевый (ЛС) и фосфолипиды кислые соевые (ФКС). Активным началом ЛС является полиненасыщенный ФХ, представляющий собой универсальный строительный материал для клеточных мембран и одно из наиболее важных веществ, поддерживающих функциональное состояние печени. Второй фосфолипидный компонент препарата Липоферол – ФКС - представляет собой в основном анионные, отрицательно заряженные ФЛ (преимущественно ФИ), наличие которых обеспечивает стабильность липосом, а также предотвращает их агрегирование и прилипание к стенкам кровеносных сосудов.

Для хроматографического анализа проводили сравнительную оценку четырех типов аналитических пластин Сорбфил размером 10×10 см фирмы «Ленхром» :

1. на стеклянной подложке (ПТСХ-С-А) без люминофора,
2. на полимерной подложке (ПТСХ-П-А-УФ) с люминофором,
3. на алюминиевой подложке (ПТСХ-АФ-А-УФ) с люминофором,
4. на полимерной подложке (ПТСХ-П-В-УФ) с люминофором (высокоэффективные).

На всех типах пластин проведен подбор условий, обеспечивающих высокую разрешающую способность ТСХ [4].

Пластины на стеклянной подложке предварительно промывают смесью хлороформ:метанол (1:1) и активируют в термостате при 110° С в течение часа, а на полимерной подложке промывают ацетоном и активируют в течение 30 минут. Такая предподготовка способствует улучшению разделения фосфолипидных смесей.

В качестве «свидетелей» исследуемых фосфолипидов (ФХ, ФЭА, ФИ) использовали стандарты фирм «Larodan AB» (Швеция) и «Calbiochem» (Германия).

На пластины наносят микрошприцем стандартные растворы ФЛ в зависимости от изучаемого объекта: ФХ, ФЭА, ФИ в количестве 1,5-2,0-2,5 мкл и исследуемые фосфолипидные смеси в количестве, определяемом экспериментально (от 2,0 до 5,0 мкл). Концентрация исследуемых растворов фосфолипидных компонентов составляет 20 мг/мл.

Известно, что для разделения ФЛ растительного происхождения методом ТСХ наиболее широко используются системы, состоящие из хлороформа, метанола, воды и раствора аммиака (с незначительно различающимися соотношениями растворителей), впервые описанные Скипски, Барклаем, Раузером и др. [5].

Нами для разделения анализируемых фосфолипидных смесей были опробованы следующие варианты систем растворителей:

1. хлороформ-метанол-25% аммиак в соотношении 65:30:5 (одинарное и двойное элюирование);
2. хлороформ-метанол-вода в соотношении 65:25:4 (одинарное элюирование);
3. комбинация 2-х перечисленных выше систем (последовательное элюирование в каждой системе);
4. комбинация 2-х систем: ацетон-петролейный эфир в соотношении 1:3 и хлороформ-метанол-уксусная кислота-вода в соотношении 80:13:8:0,3 (последовательное элюирование в каждой системе).

Использование различных систем растворителей и их комбинаций не привели к заметному улучшению качества разделения анализируемых смесей ФЛ (особенно сложными для разделения оказались смеси кислых ФЛ).

Результаты и их обсуждение

Наилучшие результаты по разделению фосфолипидных смесей получены на пластинах на стеклянной подложке. К преимуществам таких пластин относится также возможность их многократной регенерации (хромовой смесью). Причем на регенерированных пластинах (за счет вымывания из адсорбента при обработке хромовой смесью мешающих разделению органических примесей) проявляется более яркая и четкая хроматографическая картина. Для проявления тонкослойных хроматограмм использовали метод, основанный на окрашивании пятен парами йода. В специальную йодную камеру с притертой крышкой с возогнанными над пламенем спиртовки кристаллами йода помещают хроматограмму на 7-10 минут, затем извлекают её и вводят в денситометр Ден Скан. Неплохие результаты получены при использовании пластин на полимерной подложке, однако эти пластины, по сравнению со стеклянными, активнее сорбируют йод, а окрашенный фон пластины мешает идентификации пятен ФЛ и искажает результаты анализа. Кроме того, разрешающая способность полимерных пластин немного ниже стеклянных.

В результате сравнительной оценки оптимальным признан третий вариант, заключающийся в последовательном элюировании разделяемых смесей ФЛ сначала в системе растворителей хлороформ-метанол-25% аммиак (65:30:5), а затем - в системе хлороформ-метанол-вода (65:25:4). Все процессы хроматографирования проводят при комнатной температуре. Такая комбинация систем растворителей и была рекомендована для качественного и количественного определения фосфолипидного состава субстанций препарата Липоферол.

Применяемый нами для анализа денситометр Ден Скан обеспечивает расчет параметров и количественную оценку хроматограмм в видимой области (350 нм). Результаты, полученные с использованием программы DENS, в качестве примеров представлены на рисунках и в таблицах (для субстанции ФКС - на рисунках 1,2,3 и в таблицах 1,2, а для субстанции ЛС - на рисунках 4,5,6 и в таблицах 3,4).

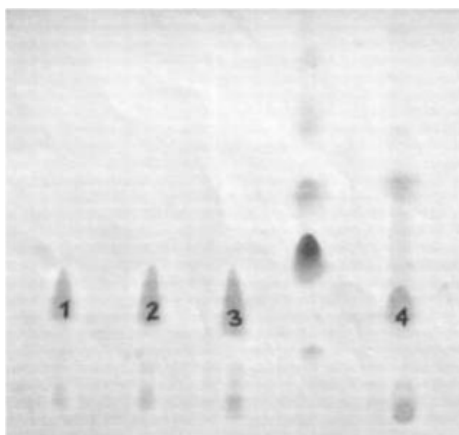


Рис.1. Хроматограмма фосфолипидных субстанций препарата Липоферол ЛС и ФКС
(1,2,3 – пятна стандартов ФИ различной концентрации; 4 – пятно ФИ на хроматограмме ФКС)

Таблица 1

Результаты количественной оценки содержания ФИ в субстанции ФКС

№ пятна	V (оптич. ед.)	Количество, %	Площадь, %	Концентрация (С)	Сигнал/шум	Rf
1	70220	21,06	23,56	1,500	58,6/1,4	0,29
2	88129	26,43	26,76	2,000	64,7/1,0	0,28
3	99205	29,75	26,77	2,500	71,8/1,6	0,26
4	75940	22,77	22,90	$x = 1,664$	63,9/1,9	0,27

Денситометрический сигнал

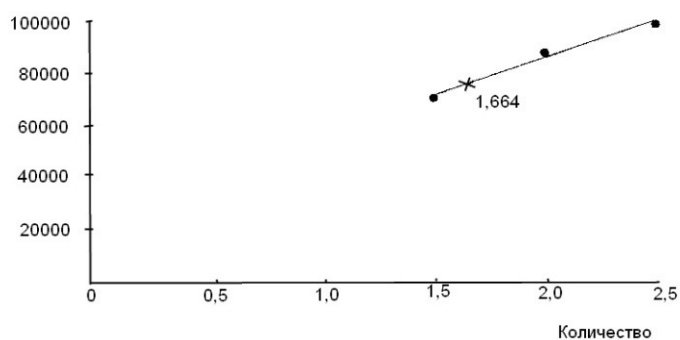


Рис 2. Линейная аппроксимация



Рис. 3. Хроматограмма ФКС (рабочая область)

Таблица 2

Результаты количественной оценки фракционного состава субстанции ФКС

№ пятна	V (оптич. ед.)	Количество, %	Площадь, %	Сигнал/шум	Rf
1	6518	3,44	12,72	12,1/0,7	0,67
2	55121	29,12	27,72	56,7/1,4	0,02
3	88353	46,68	37,10	66,4/1,1	0,26
4	39276	20,75	22,45	47,1/1,3	0,55
5	0	0,00	0,00	0,0/0,0	0,00

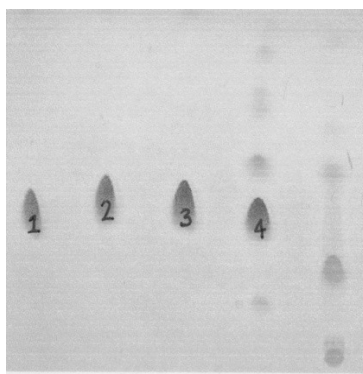


Рис.4 Хроматограмма фосфолипидных субстанций препарата Липоферол ЛС и ФКС (1,2,3 – пятна стандартов ФХ; 4 – пятно ФХ на хроматограмме ЛС)

Таблица 3

Результаты количественной оценки содержания ФХ в субстанции ЛС

№ пятна	V (оптич. ед.)	Количество, %	Площадь, %	Концентрация (С)	Сигнал/шум	Rf
1	108080	19,64	23,98	1,500	89,6/2,9	0,41
2	139031	25,27	25,54	2,000	104,7/4,3	0,45

3	158633	28,83	25,93	2,500	114,8/3,2	0,44
4	144452	26,25	24,56	$\bar{x} = 2,179$	111,3/2,9	0,40

Денситометрический сигнал

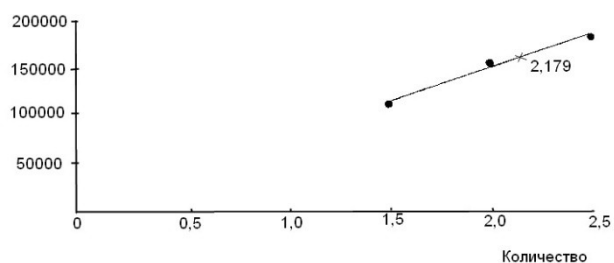


Рис 5. Линейная аппроксимация

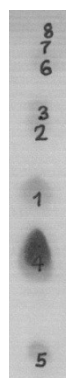


Рис. 6. Хроматограмма ЛС (рабочая область)

Таблица 4

Результаты количественной оценки фракционного состава субстанции ЛС

№ пятна	V (оптич. ед.)	Количество, %	Площадь, %	Сигнал/шум	Rf
1	63208	21,52	27,49	52,0/1,7	0,54
2	11842	4,03	6,15	35,6/1,6	0,70
3	7019	2,39	4,83	27,0/6,0	0,75
4	168920	57,50	35,21	107,5/1,5	0,39
5	29975	10,20	16,55	41,2/0,9	0,15
6	22945	4,07	7,93	29,9/3,1	0,86
7	196	0,07	0,47	7,0/1,5	0,91
8	675	0,23	1,37	8,3/1,6	0,95

Полученные данные о количественном содержании основных фракций ФЛ (ФХ, ФЭА и ФИ) для 15 серий субстанций препарата Липоферол позволили уточнить оптимальный фосфолипидный состав этих субстанций. Результаты фракционного состава субстанций из проанализированных серий приведены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5

Содержание основных фосфолипидных фракций в образцах ЛС

Наименование фосфолипидных фракций	Содержание фосфолипидных фракций в образцах ЛС, %	Требования ФСП (для ЛС)
ФХ	$61,48 \pm 2,69$	Не менее 55%
ФЭА	$18,52 \pm 1,12$	Не более 20%

Таблица 6

Содержание основных фосфолипидных фракций в образцах ФКС

Наименование фосфолипидных фракций	Содержание фосфолипидных фракций в образцах ФКС, %	Требования ФСП (для ФКС)
ФИ	$49,26 \pm 2,14$	Не менее 40%
ФЭА	$20,14 \pm 1,06$	Не более 25%

Таким образом, нами представлен усовершенствованный метод тонкослойной хроматографии для определения фракционного состава фосфолипидных смесей.

Разработаны условия хроматографирования: тип пластин, оптимизированный состав системы растворителей, выбран метод обнаружения фосфолипидов. Показано, что применяемое оборудование для высокоэффективной ТСХ (денситометр Ден Скан с использованием программы «DENS» для Windows) позволяет получать достоверные результаты и подтвердить их воспроизводимость. Метод удобен, благодаря скорости исполнения, универсальности и отсутствию разрушающего воздействия на липиды.

По мнению экспертов Научного центра экспертизы средств медицинского применения (НЦ ЭСМП) этот усовершенствованный метод ТСХ отвечает всем требованиям, предъявляемым к валидации методов количественного определения компонентов лекарственных липосомальных препаратов. Это является обязательным условием при регистрации нового лекарственного препарата в Государственном реестре лекарственных средств (составление регистрационного досье на препарат).

Заключение

В заключение необходимо отметить, что представленный в статье усовершенствованный метод ТСХ фосфолипидов включён в проекты фармакопейных статей предприятия (ФСП) на субстанции ЛС и ФКС липосомального препарата Липоферол как один из методов количественного и качественного контроля. Показано, что содержание основных фосфолипидных фракций в субстанциях препарата Липоферол соответствует требованиям ФСП.

Считаем что, полученные нами данные будут представлять определенный интерес для разработчиков инфузионных липосомальных препаратов с использованием фосфолипидных компонентов.

Литература

1. Ипатова О.М., Прозоровская Н.Н., Торховская Т.И. и др. Биологическая активность соевых фосфолипидов // Биомедицинская химия. - 2004. – Т. 50, № 5. – С. 436-450.
2. Пахомова И.Г., Успенский Ю.П. Эссенциальные фосфолипиды: свойства и особенности // Гастроэнтерология. – 2010. - №1. – С. 75-79.
3. Малявина В.В. Применение программных средств визуализации и обработки данных ТСХ-анализа при производстве фосфолипидных продуктов // Фармация. – 2003. - №2. – С. 26-30.
4. Сикорская А.С., Назарова А.А., Селеменев В.Ф. Подбор оптимальных условий разделения фосфолипидных комплексов, полученных из семян подсолнечника // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9, № 2. – С. 215-219.
5. Сафонова Е.Ф., Назарова А.А., Селеменев В.Ф. и др. Выбор оптимальных параметров разделения фосфолипидов в тонком слое сорбента // Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36, № 4. – С. 41-43.