

Контроль качества растительных препаратов промышленного и аптечного производства с использованием системы ВЭТСХ

С 3 по 30 октября 2015 г. сотрудники Национального фармацевтического университета (НФаУ) Александр Здорик и Екатерина Хохлова прошли международную стажировку в лаборатории компании SAMAG (г. Муттенц, Швейцария). Целями стажировки были тренинг по использованию оборудования и программного обеспечения (ПО) высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) для контроля качества синтетических препаратов и лекарственных средств на растительной основе; обмен опытом в сфере контроля качества и регулирования лекарственных растительных средств в Украине; разработка методик проведения ВЭТСХ такого лекарственного растительного сырья (ЛРС), как плоды и цветки с листьями боярышника, корневища с корнями родиолы розовой и родиолы четырехчленной и лекарственные растительные средства, содержащие данное ЛРС; разработка методик идентификации и изучение химической стабильности микстуры аптечного приготовления; обсуждение и разработка проекта общей статьи «Высокоэффективная тонкослойная хроматография» для Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ)



Екатерина Хохлова,

канд. фарм. наук, ассистент кафедры аптечной технологии лекарств им. Д.П. Сала, НФаУ
kateryna_khokhlova@ukr.net



Александр Здорик,

канд. фарм. наук, доцент, декан факультета промышленной фармации, управления и администрирования, НФаУ

ВЭТСХ, инструментальная тонкослойная хроматография (ТСХ) – это современный аналитический метод, используемый для контроля качества ЛРС, лекарственных средств на растительной

основе и синтетических препаратов промышленного производства и аптечного приготовления, диетических добавок, продуктов питания и кормов, косметических изделий. Метод используется в криминалистике,

при проведении клинических испытаний, для оценки состояния окружающей среды и т. д. Стандартизация условий метода ВЭТСХ и автоматизированное оборудование позволяют обеспечить воспроизводимые результаты, поэтому сегодня в монографии на ЛРС ведущих фармакопей мира методики ВЭТСХ все чаще рассматривают как альтернативу или замену методикам ТСХ. Несмотря на широкое использование ВЭТСХ в мире, в Украине данный метод только приобретает популярность. Причинами недостаточного распространения ВЭТСХ являются отсутствие материальной и методической базы, недостаток квалифицированных специалистов, имеющих практические и теоретические навыки работы с оборудованием и умеющих правильно интерпретировать результаты ВЭТСХ.

История возникновения ТСХ.

Метод ТСХ был предложен в 1938 г. украинскими учеными – чл.-кор. НАН Украины, д-ром хим. наук Н.А. Измайловым и канд. фарм. наук М.С. Шрайбер для проведения разделения и анализа в тонком слое алюминия оксида алкалоидов, полученных из экстрактов растений [1]. Толчком к проведению таких исследований послужили идеи выдающегося ботаника и биохимика М.С. Цвета, изложен-

ные в работе «Адсорбционный анализ и хроматографические методы» [2]. Потребовалось, однако, еще более 20 лет, прежде чем этот метод получил всеобщее признание.

Значительный вклад в развитие «поверхностной хроматографии» внесли немецкие ученые. В 1949 г. Д. Мейнхардт и Н. Холл зафиксировали сорбент алюминия оксид на стеклянной пластинке, используя в качестве связующего вещества крахмал, что способствовало стабилизации пластинки и устранению образования трещин [3]. В 1951 г. Д. Кирхнер, Д. Миллер и Г. Келлер модифицировали данный метод, добавив в сорбент цинка силикат и смесь цинка сульфида и кадмия сульфида как индикаторы для визуализации соединений, абсорбирующихся в УФ-свете [4].

Всеобщее признание метод получил в 1956 г. после выхода в свет работы немецкого ученого Е. Штала [5]. Именно Шталь стандартизировал технику разделения и ввел ее в рутинный анализ. С того времени ТСХ стала одним из основных методов органической химии для проведения анализа самых разнообразных органических соединений.

Возникновение ВЭТСХ. В начале 1970 г. Р. Е. Кайзер применил хроматографические пластинки без связующего вещества с использованием силикагеля с малым размером (5 мкм) и частым распределением частиц. При этом время проведения анализа сократилось с часов до минут, а разделительная способность значительно улучшилась. Результаты работы вошли в монографию «ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография», опубликованную в 1977 г. [6]. В середине 70-х годов прошлого столетия Х. Халпапом (компания «Мерк») были изобретены и выпущены в продажу ВЭТСХ-пластинки на силикагеле размером 10 – 10 см, что позволило использовать микроколичества веществ и анализировать большее число образцов [7].

Развитие ТСХ потребовало разработки специального оборудования. Так, в 1961 г. швейцарская компа-

ния SAMAG стала выпускать первое оборудование и аксессуары для проведения ТСХ, а с 1975 г. сосредоточила свою деятельность на автоматизации анализа. В 1980 г. SAMAG выпустила ПО, позволяющее автоматизировать отдельные этапы ТСХ / ВЭТСХ, которую стали называть планарной хроматографией [8].

Значительный вклад в развитие ТСХ / ВЭТСХ для проведения анализа ЛРС внесла работа Х. Вагнера и С. Бладт, опубликованная в 1984 г. и переизданная в 1996 г. [9]. В 2007 г. Е. Райх и А. Шибли опубликовали книгу «ВЭТСХ для анализа лекарственных растений», в которой изложили не только теоретические, но и практические подходы к разработке и валидации методик в соответствии с требованиями GMP и др. [10].

В 2011 г. вышла в свет работа Б. Шпангенберга и соавторов, посвященная рассмотрению различных аспектов выполнения количественной ТСХ [11].

SAMAG: оборудование и научные исследования. На сегодня швейцарская компания SAMAG – не только ведущий мировой производитель оборудования для проведения ТСХ / ВЭТСХ, но и международный центр научных исследований в области ВЭТСХ. Ежегодно компания инвестирует около 10 % оборота в проведение исследований, направленных на улучшение воспроизводимости, эргономики и автоматизации приборов. Под руководством Е. Райха, PhD, в лаборатории SAMAG проводится работа по созданию концепции ВЭТСХ, стандартизации условий, обеспечивающих воспроизводимые результаты, разработке и валидации методик контроля качества ВЭТСХ. Компания SAMAG проводит тренинги, а также сотрудничает с приглашенными специалистами и аспирантами из высших учебных заведений со всего мира.

ТСХ / ВЭТСХ в фармакопейном анализе. Первая ссылка на методику ТСХ была приведена в Немецкой фармакопее в 1964 г. В 1974 г. в 1-е издание Европейской фармакопеи была введена общая статья по ТСХ. Сегодня метод ТСХ входит практиче-

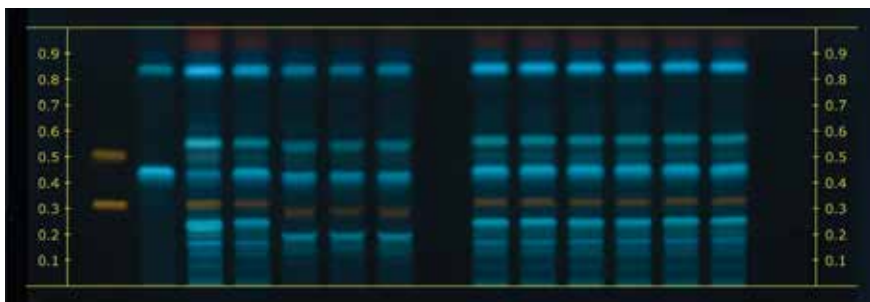
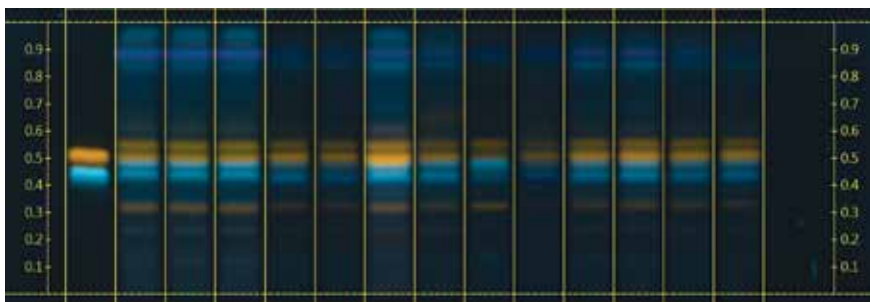
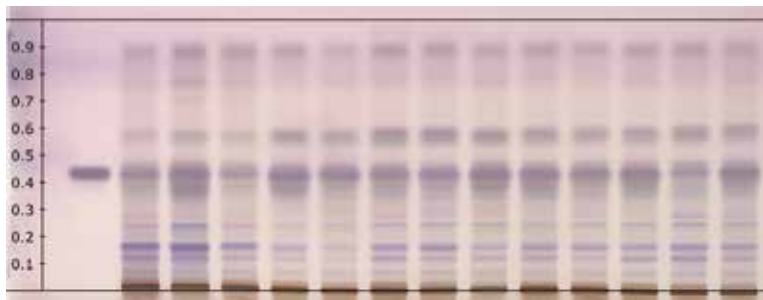
ски во все фармакопеи мира [12, 13]. В 2009 г. вышло в свет первое издание компендиума по диетическим добавкам Американской фармакопеи, где в приложениях приведены как ТСХ-, так и ВЭТСХ-методики на растения и включены цветные снимки хроматограмм [13]. В 2013 г. Американская фармакопея выпустила онлайн-компендиум растительных средств с постоянно обновляющимися монографиями, где в методиках ТСХ регламентируются условия проведения анализа (температура, влажность), указан средний размер частиц пластин, а также приведены снимки ВЭТСХ-хроматограмм [14]. По сути, происходит плавная трансформация методик ТСХ в ВЭТСХ. В августе 2015 г. в официальное издание USP 38-NF 33 были введены две общие статьи по ВЭТСХ:

- <203> «Процедура высокоэффективной тонкослойной хроматографии для идентификации средств растительного происхождения»;
- <1064> «Идентификация средств растительного происхождения по процедуре высокоэффективной тонкослойной хроматографии» [14].

На сегодня проект общей статьи 2.8.25 «Высокоэффективная тонкослойная хроматография» для Европейской фармакопеи находится на рассмотрении в Pharmedica 27.1 (EDQM) [15]. Поскольку ГФУ гармонизирована с Европейской фармакопеей, а также может использовать стандарты качества Американской фармакопеи, актуальной представляется разработка проекта общего метода и методик ВЭТСХ для ГФУ, которые после прохождения процедуры обсуждения могут быть включены в ГФУ.

Программа стажировки включала:

- изучение СОП в ВЭТСХ;
- приобретение практических навыков работы на оборудовании ВЭТСХ;
- работу с ТСХ-МС Интерфейсом-2, ПО visionCATs;
- тренинг по разработке методик контроля качества и валидации методик ВЭТСХ в соответствии с требованиями Руководств ICH;



Примеры ВЭТСХ хроматограмм, сверху вниз: родиола; боярышник; настойка боярышника; экстемпоральная мазь

- проведение испытаний по установлению идентификации и чистоты; проведение испытаний по биоколичественному определению;
- разработку методик ВЭТСХ для ЛРС и фитопрепаратов;
- разработку методик идентификации и изучение химической стабильности микстуры аптечного приготовления с помощью метода ВЭТСХ.

Исследование проводилось с помощью усовершенствованной линейки оборудования для ВЭТСХ (компания CAMAG), включающей:

- автоматический аппликатор Automatic TLC Sampler ATS 4;
- камеру для автоматического элюирования Automatic Development Chamber ADC 2;

- устройство для нагревания пластинок TLC Plate Heater;
- устройство для иммерсии пластинок Chromatogram Immersion Device;
- устройство для документирования и оценки результатов анализа TLC Visualizer;
- ПО visionCATs.

Также использовались:

- TLC Scanner 4;
- CAMAG TLC-MS INTERFACE 2.

Современный анализ был бы немыслим без колоночной и планарной хроматографии, которые дополняют друг друга. В рамках бесед с Е. Райхом, руководителем лаборатории CAMAG, была обсуждена актуальность метода ВЭТСХ, проанализи-

зированы преимущества ВЭТСХ по сравнению с колоночной хроматографией, рассмотрены вопросы использования ВЭТСХ для определения подлинности ЛРС и др.

По сравнению с колоночной хроматографией ТСХ имеет ряд преимуществ:

- возможность визуальной оценки результата;
- относительная простота проведения анализа;
- возможность выполнения параллельного анализа образцов;
- скорость проведения анализа;
- гибкость (возможность менять различные факторы);
- однократное использование пластинок;
- возможность оценивать пластинку в нескольких режимах детекции;
- относительно невысокая стоимость анализа.

Вместе с тем использование в методе ТСХ пластинок, которые являются открытой системой, обуславливает влияние на результаты анализа влажности и температуры окружающей среды. По этой причине в промышленности для количественного определения предпочтительнее отдается методу высокоэффективной жидкостной хроматографии, а не ТСХ. Однако благодаря созданию камеры для автоматического элюирования Automatic Development Chamber ADC 2, позволяющей контролировать температуру и относительную влажность, данная проблема была решена. Возникнув первоначально как качественный метод анализа, сегодня ВЭТСХ с успехом используется для полуколичественного и количественного определения. Современные приборы для нанесения образцов, автоматизированные хроматографические камеры, приборы для опрыскивания или иммерсии обеспечивают необходимый уровень автоматизации, надежности, независимости от внешних факторов и обуславливают применение робастных аналитических методов [11].

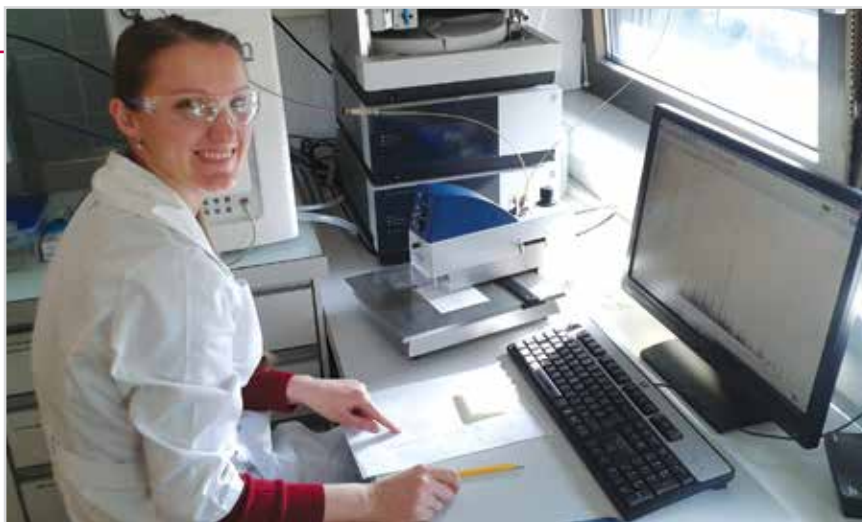


*Eike Reich (слева)
Александр Здорик (справа)*

Использование ВЭТСХ для проведения анализа ЛРС и лекарственных средств на растительной основе. Встречи сотрудников НФаУ с Д. Фромменвилер и В. Майре-Видмер стали источником бесценных сведений об использовании ВЭТСХ для контроля качества растений, возможности выявления недопустимых примесей и обнаружения фальсификата. Присущая внутривидовая изменчивость БАВ ЛРС и наличие различных сходных видов ЛРС создают трудности при стандартизации фитопрепаратов, что следует учесть при разработке методик контроля качества [10].

По результатам стажировки были разработаны ВЭТСХ-методики контроля качества для различных видов боярышника, родиолы и нескольких фитопрепаратов отечественного производства с данным ЛРС; разработаны методики идентификации для микстуры аптечного приготовления и изучена ее химическая стабильность.

Идентификация настойки боярышника. Настойка из плодов боярышника входит в ТОП-продаж фитопрепаратов на отечественном фармацевтическом рынке. Согласно Государственному реестру лекарственных средств на фармацевтический рынок Украины поступают предложения от 13 отечественных производителей. Большое разнообразие видов боярышника, встречающихся в Украине (около 30), склонность к гибридизации и возможность использования плодов 12 различных фармакопейных видов



Екатерина Хохлова в лаборатории CAMAG (работа на CAMAG TLC-MS INTERFACE 2)

растения [12] в производстве настойки обуславливают актуальность и сложность определения подлинности препарата.

В нашем исследовании было проанализировано 13 образцов настойки боярышника разного года выпуска от восьми производителей Украины и России. Идентификацию настойки боярышника с помощью метода ВЭТСХ проводили по флавоноидам [12, 13].

Все исследуемые образцы прошли тест ВЭТСХ по разработанной методике: хроматографические отпечатки 13 образцов настойки были однородными по расположению, цвету и интенсивности маркерных зон. Специфичность результатов была подтверждена результатами сравнения хроматограмм образцов промышленного производства, лабораторного образца настойки, приготовленного из аутентичного ЛРС (плодов боярышника), и испытуемого раствора из плодов боярышника [16].

Идентификация корневищ с корнями родиолы розовой и жидкого экстракта родиолы розовой. В последнее время контроль качества родиолы розовой и препаратов на ее основе вызывает большой интерес во всем мире. На рынке США и Европы родиола розовая представлена преимущественно диетическими добавками в виде сухого экстракта в форме капсул и таблеток. Отечественные и российские производители выпускают на основе родиолы розовой препараты в форме жидкого экстракта и диетические добавки в форме фиточая, которые, по сути,

являются измельченным и фасованным ЛРС родиолы.

На сегодня в ГФУ монография на ЛРС родиолы розовой отсутствует. Сложность определения подлинности ЛРС родиолы розовой по ее макро- и микроскопическим признакам, близкий химический состав различных видов растения и отсутствие современного метода для идентификации данного сырья обусловили актуальность разработки методики ВЭТСХ для корневищ с корнями родиолы розовой и препаратов на ее основе.

В исследовании было проанализировано 13 образцов ЛРС родиолы розовой из России и Украины (в том числе две диетические добавки в форме чая) разного года выпуска и три образца жидкого экстракта родиолы розовой. Идентификацию ЛРС и препаратов родиолы розовой проводили по маркерным веществам: розавину, розарину и салидрозиду [14].

На основании полученных результатов было установлено, что из 11 образцов корневищ с корнями родиолы розовой 4 не имеют характерного хроматографического профиля и не проходят тест ВЭТСХ по предложенной методике. Любопытно, что предварительно проведенные тесты макро- и микроскопии анализируемого ЛРС дали положительный результат и не выявили фальсификата. На хроматограммах промышленных образцов жидкого экстракта родиолы розовой также отсутствовал салидрозид или розавин либо оба маркерных вещества, с которыми связы-

вают терапевтическую активность растения. В то же время лабораторные образцы жидкого экстракта родиолы розовой, приготовленные из аутентичного ЛРС родиолы, имеют специфичный хроматографический отпечаток. Вероятно, отсутствие маркерных веществ в препаратах родиолы может быть связано или с использованием в его производстве сырья ненадлежащего качества, или с неправильным хранением препарата.

Изучение стабильности микстуры аптечного приготовления. Альтернативой лекарственным средствам промышленного производства являются препараты аптечного приготовления. Согласно общим требованиям ГФУ срок годности экстемпоральных препаратов зависит от их лекарственной формы и условий хранения [12]. В аптечной практике существуют часто используемые прописи в различных формах выпуска, для которых целесообразным является изучение стабильности [17].

Объектом исследования стал водный раствор для внутреннего применения, содержащий в качестве активных ингредиентов смесь настоек пустырника и валерианы и 2 % раствор натрия бромида. Данный препарат обладает седативными свойствами и используется как успокоительное средство в педиатрии.

Поскольку в данной прописи содержатся растительные компоненты, для ее идентификации и изучения стабильности при хранении рационально было использовать метод ТСХ. Анализ водных растворов с помощью метода ТСХ довольно затруднителен, так как вода – сильно полярный растворитель, который при нанесении долго испаряется с поверхности пластинки и нарушает целостность слоя силикагеля. К тому же анализируемые вещества в прописи находятся в низкой концентрации (высокое разведение), поэтому объем для нанесения должен быть довольно большим, что обуславливает невозможность применения ТСХ. В данном случае метод ВЭТСХ является идеальным вариантом для идентификации и изучения стабильности. Использование микроколичеств ве-

ществ, процедуры пробоподготовки, автоматического аппликатора ATS 4, оборудованного нагреванием иглы, позволили разработать воспроизводимые методики идентификации, пригодные для изучения стабильности водного раствора аптечного приготовления, содержащего настойки. А ПО visionCATs позволило сравнивать хроматографические «отпечатки» снимков хроматограмм, полученных в разное время выполнения анализа.

Изучение химической стабильности экстемпоральной прописи с помощью метода ВЭТСХ проводили на трех сериях в течение 21 дня. При изучении стабильности контролировали маркерные вещества кислоты валериановая и ацетоксивалериановая, специфичные для валерианы, и определяли хроматографический профиль флавоноидных соединений, специфичный для пустырника [12].

Полученные результаты свидетельствуют о химической стабильности экстемпорального раствора с растительными ингредиентами в течение 21 дня.

На заключительном этапе стажировки, а также в ходе заседаний «круглых столов» с Е. Райхом были обсуждены особенности стандартизованной процедуры ВЭТСХ в фармакопейном анализе и рассмотрена возможность разработки проекта общей статьи «Высокоэффективная тонкослойная хроматография»

для ГФУ, учитывающего национальные особенности разработки монографий.

Заключение

Данные анализа ЛРС и препаратов промышленного и аптечного производства, полученные в результате стажировки в лаборатории компании CAMAG, подтвердили широкие возможности метода ВЭТСХ для стандартизации отечественных фитопрепаратов. Методики, разработанные с помощью метода ВЭТСХ, дают возможность определить подлинность, выявить некачественное сырье и фальсификат, а также идентифицировать и изучить химическую стабильность для установления сроков годности ЛРС и экстемпоральных препаратов.

Материалы, собранные в ходе экспериментальных исследований, могут быть использованы при разработке ВЭТСХ-методик для монографий на плоды и цветки с листьями боярышника, корневища с корнями родиолы розовой и родиолы четырехчленной, настойку боярышника, жидкий экстракт родиолы розовой, а также для создания проекта общей статьи ВЭТСХ для ГФУ.

Результаты стажировки будут включены в учебный и научный процесс кафедр фармацевтической химии и аптечной технологии лекарств им. Д.П. Сала НФаУ и других фармацевтических факультетов Украины. ■

Литература:

1. Измайлов Н. А., Шрайбер М. С. / **Капельно-хроматографический метод анализа и его применение в фармации** // Фармация. – 1936. – № 3. – С. 1-7.
2. Tswett M. S. **Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls** // Ber. Dtsch. Botan. Ges. – 1906. – № 24. – S. 384-393.
3. Meinhard J. E., Hall N. F. **Surface Chromatography** // Anal. Chem. – 1949. – № 21. – P. 185-188.
4. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J. **Separation and identification of some terpenes by a new chromatographic technique** // Anal. Chem. – 1951. – № 23. – P. 420-425.
5. Stahl E., Schröter G., Renz R. **Dünnschicht-Chromatographie** // Pharmazie. – 1956. – P. 633-637.
6. Zlatkis A., Kaiser R.E. **HPTLC – high performance thin-layer chromatography**. Elsevier, Amsterdam, 1977.
7. Rippahn R., Halpaap H. **Quantitation in high-performance micro-thin-layer chromatography** // J. Chromatogr. – 1975. – № 112. – P. 81-96.
8. Электронный ресурс: <http://www.camag.com/en/home.cfm>
9. Wagner H. **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas** / H. Wagner, S. Blatt. – 2-nd ed. – Berlin : Springer-Verlag, 1996. – 384 p.
10. Reich E. **High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants** / E. Reich, A. Schibli. – New-York: Thieme, 2007. – 264 p.
11. Spangenberg B., Poole C. F., Weins Ch. **Quantitative Thin-Layer Chromatography. A practical survey**. Heidelberg, Springer, 2011. – 388 p.
12. **Державна Фармакопея України**. – В 3-х томах. – 2-ге вид. – Том 3. – Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014.
13. **USP Dietary Supplement Compendium**. – 1-st ed. – Rockville, 2009. – 1577 p.
14. **USP Herbal Medicines Compendium**. Электронный ресурс: <http://hmc.usp.org/>
15. **Pharmeuropa**. Электронный ресурс: <http://pharmeuropa.edqm.eu/>
16. Khokhlova K.O. **Quality control of Hawthorn tincture by HPTLC method** // Annals of Mechnikov Institute. – 2016. – №3. – P. 56-60.
17. **Investigation of physical and chemical stability of ointment with herbals** / O. A. Zdyryk, K. O. Khokhlova, V. A. Georgiyants, L. I. Vyshnevskva // JPC. – May / June 2014. – P. 248-252.