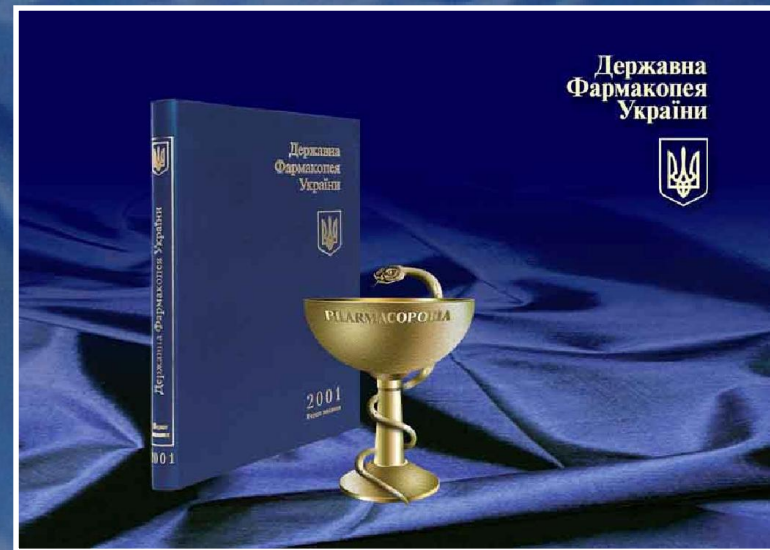


Классификация фармакопейных подходов к количественному определению лекарственного растительного сырья и суммарных фитопрепаратов



Державна
Фармакопея
України



Гризодуб А.И., доктор хим. наук, профессор
*ГП «Український науковий фармакопейний центр
якості лікарських засобів», Харків*

Что такое суммарные препараты?

Суммарные препараты – это ЛС, в которых биологическая активность связана с большим количеством соединений, многие из которых могут быть неизвестны и концентрации которых (как абсолютные, так и относительные) могут колебаться в широких пределах. Эти концентрации определяются свойствами сырья и технологии и не могут быть изменены по желанию.

Типичные примеры суммарных препаратов - лекарственное растительное сырье (ЛРС) и препараты из него (настойки, экстракты и т.д.).



Проблема стандартизации ЛРС-1

- 3-8 октября 2013 г. в Дублине состоялся Юбилейный 100-летний Конгресс FIP, в рамках которого состоялось Сопещение Мировых Фармакопей.
- Целое заседание было посвящено стандартизации ЛРС. Большой интерес вызвало выступление представителя Ирана, который показал, что один и тот же вид ЛРС может иметь разный химический состав в зависимости от высоты, региона и страны (Prof. Farshad Shirazi (Iran). Challenges in Writing Herbal Medication Pharmacopeia Monographs).
- Так, мята перечная в Южной Америке содержит до 20% канцерогенного соединения, и ее бояться даже брать в руки, не говоря уже о возможности лекарственного применения. А у нашей мяты перечной этот алкалоид отсутствует, и это растение является популярным растительным лекарственным средством.



Проблема стандартизации ЛРС-2

- Представленные разными докладчиками данные о существенном варьировании по регионам состава ЛРС ставят под сомнение возможность единых международных требований к качеству ЛРС.
- Единообразия состава ЛРС можно добиться применением GACP (Good Agricultural and Collection Practice – Надлежащая практика культивирования и сбора лекарственных растений), однако такая унификация, кроме пользы (унификация состава и действия ЛРС), имеет и отрицательные моменты.
- Было высказано мнение, что единые фармакопейные требования к ЛРС из разных регионов лишают ЛРС их того лечебного действия, которое характерно для каждого района и которое отражено в народной медицине..
- Для Украины и других стран СНГ характерно широкое применение дикорастущего ЛРС. Поэтому проблема его стандартизации является очень актуальной.



Растительные суммарные препараты (СП) в ГФУ

Украина – член Европейской Фармакопеи (ЕФ). Поэтому Государственная Фармакопея Украины (ГФУ) гармонизована с ЕФ. ГФУ содержит как европейские, так и национальные требования, которые не противоречат ЕФ.

В ГФУ 2.0 описаны монографии на 172 наименования ЛРС и препаратов из него:

- 149 видов ЛРС (17 национальные),
- 11 эфирных масел,
- 12 настоек (2 национальные).

Столь широкий набор монографий позволяет провести их сравнительный анализ с целью выявления основных тенденций развития методов количественной стандартизации ЛРС и суммарных препаратов и формирования национальной фармакопейной концепции их качества с целью введения ее в ГФУ.

Полученные при этом выводы имеют достаточно общий характер для всех стран СНГ.



Основные задачи исследования

1. В отличие от синтетических, суммарные препараты содержат большое количество различных, часто неизвестных, соединений. Какой смысл мы вкладываем тогда в понятие «Количественное определение» (КО) суммарных препаратов? Возможно ли в принципе корректное КО для суммарных препаратов? Если нет, то какова для них тогда цель КО?
2. Классификация подходов к КО суммарных препаратов и оценка их корректности.
3. Методы анализа, применяемые для КО суммарных препаратов, и их сравнительная характеристика.
4. Характеристика применения стандартных образцов.
5. Рекомендации по использованию КО в фармакопейных монографиях и спецификациях.



Фармакопейные тесты и методы, применяемые для количественной стандартизации суммарных препаратов

1. Экстрактивные вещества
2. Сухой остаток (для настоек и жидких экстрактов).
3. Эфирное масло (дистилляция).
4. Количественное определение:
 - гравиметрия
 - титриметрия
 - спектрофотометрия (СФ)
 - газовая хроматография (ГХ)
 - высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Насколько объективны эти тесты и какова их цель?



Многокомпонентные ЛС: комбинированные и суммарные препараты

В фармации широко применяются многокомпонентные ЛС. Их можно разделить на 2 группы:

- 1. Комбинированные ЛС.** Это *искусственно* приготовленная смесь нескольких индивидуальных известных действующих компонентов. Типичный пример – таблетки «Цитрамон»: ацетилсалициловая кислота 0.24 г, парацетамол 0.18 г, кофеин 0.03 г + вспомогательные вещества. Характерной особенностью комбинированных ЛС является то, что все компоненты, их концентрации и биологическая активность (БА) компоненты **известны**. Т.е. для комбинированных ЛС полностью известен качественный и количественный состав, а также парциальная активность (т.е. БА единицы концентрации) каждого компонента.
- 2. Суммарные препараты (СП).** Это *природная* смесь действующих веществ. Типичный пример - лекарственное растительное сырье (ЛРС). Характерной особенностью СП является то, что их *полный* качественный и количественный состав, как правило, **неизвестен**. Неизвестны и парциальные БА каждого компонента.



Взаимосвязь биологической активности СП с концентрациями ДВ – комбинированные ЛС-1

Количественное определение ЛС введено для оценки их биологической активности (P) и поэтому должно коррелировать с (P). В терапевтической области концентраций (C) действующих веществ (ДВ) фармакопейную концепцию взаимосвязи P и C для **комбинированных синтетических** (chemically defined) ЛС можно описать соотношением:

$$P_i = \sum_{j=1}^{j=m} p_{ij} \cdot C_j + \Phi(C_1, C_2 \dots C_m). \quad i = 1 \dots n, \quad (1)$$

P_i - биологическая активность (БА) i -ого типа,

p_{ij} - парциальная БА i -ого типа для j -ого ДВ;

C_j – концентрация j -ого ДВ;

$\Phi(C_1, C_2 \dots C_m)$ – нелинейные эффекты.



Взаимосвязь биологической активности СП с концентрациями ДВ – комбинированные ЛС-2

Физический смысл уравнения (1) достаточно прост. Каждый компонент (j -ое ДВ) комбинированного ЛС обладает несколькими видами БА, которая характеризуется активностью единицы концентрации (парциальной активности). Любая выбранная (i) БА, связанная с данным j -ым компонентом, равна произведению его парциальной активности на концентрацию.

Суммарная БА комбинированного ЛС равна сумме активностей всех его компонентов. Плюс эффекты взаимодействия (нелинейные эффекты). Разные компоненты могут усиливать БА друг друга (синергизм), а могут и ослаблять (антагонизм). В частности, известен синергизм и антагонизм антимикробных средств.



Взаимосвязь биологической активности СП с концентрациями ДВ – комбинированные ЛС-3

Нелинейные эффекты очень трудно оценить, поэтому при стандартизации ЛС полагают, что ими можно пренебречь, т.е. $\Phi = 0$. Тогда соотношение (1) для терапевтической области концентраций принимает вид:

$$P_i = \sum_{j=1}^{j=m} P_{ij} \cdot C_j. \quad i = 1 \dots n. \quad (2)$$

Из соотношения (2) видно, что биологическая активность i -ого типа P_i **полностью определяется концентрациями (C_j)** ДВ. Стандартизуя эти концентрации и допуски для них, мы стандартизуем БА препарата. Соотношение (2) - основа контроля качества комбинированных синтетических ЛС.



Комбинированные препараты. Пример

Таблетки «Фармадол»:

- кислоты ацетилсалициловой (АСК) 0.30 г,
- парацетамола (П) 0.10 г,
- кофеина (К) 0.05 г ,
- вспомогательные в-ва.

Допуски содержания:

АСК – 0.285 – 0,315 г. ,

П – 0.095 – 0.105 г,

К – 0.045 – 0.055 г.

Проводя количественное определение методом ВЭЖХ, мы с высокой надежностью регламентируем биологическую активность комбинированного препарата «Фармадол».

Суммарные препараты являются аналогами комбинированных ЛС, однако прямое применение уравнения (2) для них невозможно.



Суммарные препараты (СП)

В рамках фармакопейной концепции качества, соотношение (2) для СП в общем случае имеет вид:

$$P_i = \sum_{j=1}^{j=m} p_{ij}^{KN} \cdot C_j + \sum_{j=m+1}^{j=M} p_{ij}^{UKN} \cdot C_j = P_i^{KN} + P_i^{UKN}. \quad i = 1 \dots n, \quad (3)$$

Здесь индексы *KN* и *UKN* относятся, соответственно, к известным и неизвестным (или известным ДВ, но с неизвестной БА) ДВ суммарного препарата.

Соотношение (3) для СП отличается от соотношения (2) для комбинированных ЛС тем, что в него входят как известные (*KN*), так и неизвестное количество неизвестных (*UKN*) компонентов с неизвестными концентрациями и парциальными БА p_{ij} . Мало того, часто неизвестны парциальные биологические активности p_{ij} даже для известных компонентов.

Таким образом, соотношение (3) не применимо на практике для КО суммарных препаратов.



ЛРС в ГФУ 2.0: случаи отсутствия количественного определения

ЛРС часто обладает несколькими видами БА, каждая из которых связана с разными группами биологически активных соединений (БАС). Медицинское применение одного и того же вида ЛРС может быть разным.

Соответственно, для разного медицинского применения стандартизации подлежат разные группы БАС.

Поэтому для некоторых видов ЛРС трудно предложить единые фармакопейные методики КО, которые бы это учитывали. Как результат: в ГФУ 2.0 **КО отсутствует в 17 монографиях на ЛРС** (например, *Алтеї листя*).

Неприменимость на практике общего соотношения (3) к КО суммарных препаратов потребовало **разработки подходов, основанных на упрощающих допущениях.**



Классификация фармакопейных подходов к КО ЛРС и препаратов из него

Фармакопейные подходы к КО ЛРС и препаратов из него можно условно подразделить на следующие:

Подход 1. Контроль суммы концентраций экстрагируемых компонентов (как действующих, так и балластных).

Подход 2. Контроль суммы концентраций действующих компонентов.

Подход 3. Контроль концентраций сигнальных компонентов.

При переходе от *Подхода 1* к *Подходу 3* увеличивается селективность КО, но ухудшается его представительность (т.е. заключение о качестве делается по результатам все меньшего числа компонентов ЛРС). Поэтому, если в случае *Подхода 1* эффективность стандартизации ЛРС явно низка, то выбор между *Подходами 2* и *3* можно сделать лишь в каждом конкретном случае.



Подход 1. Контроль суммы концентраций экстрагируемых компонентов

Это самый простой и исторически первый подход.

Допущение: БА i -ого типа (P_i) суммарного фитопрепарата определяется суммой концентраций всех **ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ** (ES) – как действующих, так и балластных.

Соотношение (3) тогда принимает вид:

$$P_i = P_i^{KN} + P_i^{UKN} = m^{ES} \quad (4)$$

Контроль ES введен в ГФУ 2.0 в **11 видов ЛРС** (пример - *Чебрець повзучий*). Полным аналогом ES в ЛРС является **сухой остаток (RD)** в настойках. RD является практически обязательным для настоек и введен в ГФУ в **8 настоек из 12** (пример - *Арніки настойка*).

В связи с низкой селективностью, ES и RD не считаются КО и вводятся обычно только как дополнительные тесты.



Подход 2. Контроль суммы концентраций действующих компонентов - 1

Допущение 1: БА i -ого типа (P_i) связана только с какой-то одной группой известных соединений (KN) (например, флавоноидов). Концентрации остальных в-в (UKN) пропорциональны KN , а характер их БА подобен KN , т.е.:

$$C^{UKN} = a \times C^{KN} ; \Rightarrow P_i^{UKN} = a \times P_i^{KN} \quad (5)$$

Оценить парциальную БА каждого компонента суммарного препарата очень сложно, поэтому вынужденным является

Допущение 2: Все парциальные БА известных компонентов одинаковы, т.е.:

$$p_i^{KN} = const \quad (6)$$



Подход 2. Контроль суммы концентраций действующих компонентов - 2

С учетом Допущений 1-2, соотношение (3) принимает вид:

$$P_i = \sum_{j=1}^{j=m} C_j, \quad i = 1 \dots n, \quad (7)$$

т.е. стандартизацию суммарного препарата проводят только по сумме концентраций какой-то одной группы соединений.

Несмотря на свою очевидную приближенность, соотношение (7) является основным при стандартизации суммарных препаратов и применяется в двух вариантах:

Подход 2.1. Определение суммы реальных концентраций действующих компонентов.

Подход 2.2. Определение суммы условных концентраций действующих компонентов.



Подход 2.1. Определение суммы реальных концентраций действующих компонентов

Подход 2.1.1. Оценка реальных концентраций действующих веществ в процентах

Данный подход реализуется в ГФУ только для КО эфирных масел (**11 монографий**, например, *Евкалиптова олія*), состав которых точно известен и регламентируется для всех компонентов (от 3 до 12). Анализ проводится методом ГХ внутренней нормализацией. Для идентификации всех компонентов применяют стандарты. В случае их отсутствия для некоторых компонентов приводится хроматограмма и указывается порядок выхода.

Эфирные масла – единственный пример корректной реализации соотношения (7) для КО суммарных препаратов. Их КО ничем принципиально не отличается от КО комбинированных ЛС.



Подход 2.1. Определение суммы реальных концентраций действующих компонентов

Подход 2.1.2. Использование **объемных** концентраций для оценки содержания действующих веществ

Данный подход довольно распространен в ГФУ для контроля содержания эфирного масла (ЭМ) в ЛРС – **36 монографий из 149 ЛРС**. Анализ проводится методом дистилляции и измерения объема отогнанного масла.

Недостатки: 1) Большинство ЛРС (113 видов) не содержит ЭМ.

2) Разные компоненты ЭМ могут сильно различаться по БА, поэтому в 6 ЛРС из 36 дополнительно контролируют с помощью ГХ в выделенном масле долю важных компонентов (пример, *Материнка* – не менее 60% суммы карвакрола и тимола), а в 2 ЛРС из этих 6 ЛРС ограничивают долю нежелательных компонентов (пример, *Фенхель сладкий* – не более 10% эстрагола и не более 7.5% фенхона) .

3) БА ЛРС связана не только с ЭМ. Поэтому в 14 ЛРС из 36 введено дополнительно КО других компонентов.



Подход 2.1. Определение суммы реальных концентраций действующих компонентов

Подход 2.1.3. Определение *весовой* суммы действующих в-в определенного химического класса

Такое определение описано в **5 монографиях** на ЛРС для суммы полисахаридов (пример - *Алтеї корені*), которые осаждаются этанолом и определяются гравиметрически.

Данный подход применим очень редко - когда содержание ДВ велико и они легко отделяются от других компонентов.

Однако и в этих случаях контроль только полисахаридов бывает недостаточен для стандартизации БА, и добавочно контролируются и другие ДВ (пример – для *Подорожника великого листа* - сумма производных о-дигидроксикоричной кислоты, в пересчете на актеозид, методом СФ).



Подход 2.1. Определение суммы реальных концентраций действующих компонентов

Подход 2.1.4. Определение суммы эквивалентов действующих в-в определенных химических групп

Данный подход описан в ГФУ для **6 видов ЛРС** и одной настойки. Обычно это сумма алкалоидов (*Беладони листя*) или кислот (*Гібіскус*).

Корректно определять и регламентировать именно сумму эквивалентов, но для удобства обычно ее пересчитывают на какое-то известное соединение (в нашем случае, алкалоиды – на гиосциамин, кислоты – на лимонную).

Сюда примыкает и определение **общего йода в 2 видах ЛРС**: *Бурі водорослі* и *Ламінарії сланії*.

К сожалению, данный подход применим очень редко.



Подход 2.2. Определение суммы условных концентраций действующих компонентов

Главным недостатком *Подхода 2.1* является то, что он не имеет общего характера и применим лишь к ограниченному кругу объектов. Кроме того, его невозможно применить для стандартизации фитопрепаратов в рамках самых распространенных и чувствительных фармакопейных методов – хроматографии и спектрофотометрии.

Поэтому в процессе развития методов контроля качества суммарных препаратов сформировался общий подход, основанный на использовании для их стандартизации не реальных концентраций, а некоторых пересчетных величин, которые можно назвать «**условными концентрациями**».

Данный подход применим и в хроматографии, но в случае СФ анализа суммарных препаратов является основным.



Подход 2.2. Общие уравнения-1

Основная идея **условных концентраций** – аналитический сигнал R_j (высота или площадь пика, оптическая плотность и т.д.) всех анализируемых компонентов пересчитывается на аналитический сигнал R_o вещества, принятого за единый стандарт, который затем пересчитывается (коэффициенты пересчета k_{jo}) на эквивалентную ему концентрацию единого стандарта. Общее выражение (7) для БА суммарного препарата в этом случае принимает вид

$$P = \left(\sum_{j=1}^{j=m} k_{jo} \times R_j \right) \times \frac{C_o^{st}}{R_o^{st}}. \quad (8)$$

R_o^{st} и C_o^{st} – аналитический сигнал и концентрация в растворе стандартного образца единого стандарта.



Подход 2.2. Общие уравнения-2

Применение соотношения (8) для КО суммарных препаратов требует разделения аналитических сигналов всех компонентов. Это невозможно в СФ, но возможно в хроматографии. Нужно также знание коэффициентов пересчета k_{j_0} всех компонентов, а это, как правило, невозможно. Поэтому приходится принять допущение $k_{j_0} = 1$, что приводит к уравнению:

$$P = \left(\sum_{j=1}^{j=m} R_j \right) \times \frac{C_o^{st}}{R_o^{st}}. \quad (9)$$

Выражение в скобках представляет собой сумму аналитических сигналов всех компонентов суммарного препарата. В хроматографии это сумма площадей заявленных пиков, а в СФ – оптическая плотность суммарного препарата при аналитической длине волны.



Подход 2.2. Общие уравнения-3

КО условных концентраций в варианте соотношение (9) является наиболее распространенным способом стандартизации суммарных препаратов.

Нетрудно видеть, что в этом случае **высокоселективный метод (хроматография)** не имеет преимуществ перед **малоселективным (СФ)**. Действительно, если все равно определяется сумма площадей пиков, то зачем их разделять? Проще сразу брать суммарную оптическую плотность. Возможно, этим объясняется широкое применение именно СФ в варианте соотношения (9) для КО определения суммарных препаратов.

Применение спектрофотометрии (СФ) и хроматографии (обычно ВЭЖХ) в варианте соотношения (9) имеет свои особенности.



Подход 2.2.1. СФ при определении условных концентраций

Этот подход является самым распространенным в ГФУ 2.0 для КО суммарных препаратов – он описан для **62 видов ЛРС из 172**, описанных в ГФУ 2.0. Применение СФ в этом случае имеет следующие основные особенности:

- **СФ по собственному поглощению** применяется только для **6 ЛРС** (пример - *Глоду плоди*); в остальных случаях (57 ЛРС) применяются более селективные цветные реакции;
- **Метод показателя поглощения (МПП)** применяется в **39 случаях** из 62 случаев СФ (пример – *Берези листя*);
- **Метод стандарта** используется значительно реже, в **23 случаях** из 62 (пример - *Ромашки квітки*).

Как видно, **замену метода стандарта на МПП можно считать стратегическим направлением СФ анализа лекарственных средств вообще и ЛРС в частности.**



Подход 2.2.1. СФ в ГФУ – группы соединений

1. *Определение суммы флавоноидов*
 - a. *Реакция с $AlCl_3$ с пересчетом на гиперозид или изомерный изокверцетрозид – 16 ЛРС.*
 - b. *Реакция с борной кислотой – 6 ЛРС.*
2. *Сумма производных дицинамоилметана в пересчете на куркумин – 1 ЛРС*
3. *Определение таннинов или полифенолов в пересчете на пирогаллол по общей статье 2.8.14 – 15 ЛРС.*
4. *Реакция с $FeCl_3$ и $MgAc$ - 6 ЛРС.*
5. *Реакция с $NaNO_2 + Na_2MoO_4$ - сумма гидроксикоричных кислот и других соединений в пересчете на хлорогеновую, цикориевую кислоту и т.д. – 8 ЛРС*
6. *Определение гидрохинон-производных в пересчете на арбутин – 1 ЛРС (мучниці листя)*
7. *Сумма сердечных гликозидов, в пересчете на дигитоксин – 1*
8. *Сумма алкалоидов, в пересчете на хелидонин – 1 ЛРС*
9. *Собственное поглощение – 6 ЛРС*



Подход 2.2.2. Использование хроматографии для определения условных концентраций

Данный подход с использованием только ВЭЖХ в ГФУ используется редко – 3 ЛРС.

Важный момент - идентификация целевых пиков:

- общий подход - введение двух стандартов, площади пиков между которыми принимают в расчет;
- более простой вариант – сумма площадей пиков после (или до) какого-то пика.

Выбор стандартного образца (СО):

1. СО входит в целевую группу соединений. Пересчет может делаться как на это соединение, так и на соединение, не входящее в целевую группу.
2. СО **не** входит в целевую группу соединений. Пересчет делается на соединение, входящее в целевую группу.

Коэф. пересчета могут быть достаточно произвольны, учитывая условность получаемых концентраций.



Подход 3. Контроль концентрации одного или нескольких сигнальных компонентов

В Подходе 3, проводится КО концентраций одного или нескольких конкретных (**сигнальных**) компонентов (СК). В литературе их обычно называют маркерами, но название «сигнальные компоненты» больше отражает их суть.

Поскольку «маркеры» – это то, что добавляют, а сигнальные компоненты – это то, что присутствует.

Он основан на допущении, что концентрации всех остальных ДВ пропорциональны концентрациям этих СК. Отклонение концентраций СК от регламентируемых значений указывает на нестандартность данного ЛРС.

Подход 3 в настоящее время является основным направлением развития стандартизации количественного содержания ЛРС и суммарных препаратов. Он описан в ГФУ для 23 видов ЛРС



Подход 3. Причины развития метода сигнальных компонентов (СК)

1. Применение хроматографии для определения суммы условных концентраций не имеет преимуществ перед СФ по селективности, а по простоте значительно уступает. Это видно и по частоте применения (СФ – 34, ВЭЖХ – 6).
2. **Широкое применение в ЕС GACP** значительно улучшило стандартность ЛРС, поэтому контроль СК в значительной степени позволяет контролировать и другие ДВ.
3. Методики определения суммы условных концентраций сложно поддаются валидации. Валидация же методик определения СК подобна обычным методикам.
4. Главное достоинство СК – высокая селективность, что важно при выявлении фальсификатов. Это объясняет редкое применение при использовании СК других дополнительных методов контроля.



Подход 3. Особенности применения метода СК в ГФУ 2.0

1. Основной метод – ВЭЖХ с СФ детектором (40 из 47 ЛРС).
2. ГХ с ДИП – только для *стандартизации выделяемых из ЛРС эфирных масел (6 ЛРС из 47)*.
3. Многоволновая СФ - 1 ЛРС - как исключение.
4. ВЭЖХ: обычно контролируют один СК (28 ЛРС). Реже - два СК (9 ЛРС). Анализ трех СК описано для 2 ЛРС. Четыре СК - для 1 ЛРС.
5. ГХ: 1 СК – 3 ЛРС, 2 СК – 3 ЛРС. В одном случае (*Пальми сереноа плоди*) контролируется сумма 11 СК. В одном ЛРС дополнительно контролируется максимальное содержание 1 компонента, а в одном ЛРС – двух компонентов.
6. КО, как правило, проводится методом стандарта. Только в одном случае используется метод калибровочного графика, а в 3 ЛРС для стандартизации выделяемого эфирного масла используется ГХ в варианте внутренней нормализации.



Подход 3. Особенности применения стандартных образцов (СО) в методе СК

1. При контроле СК чаще всего используются СО этих СК: ВЭЖХ - 22 ЛРС из 40, ГХ – 3 ЛРС из 6.
2. Для ВЭЖХ характерно также (14 ЛРС из 40) применение **единого СО**, на который пересчитываются все другие СК. Данный единый СО может и не принадлежать к СК. Учитывая трудность получения СО СК, данный подход может быть достаточно перспективным. При этом трудность получения СО всех СК переносится на трудность подбора единого СО.
3. Для 4 ЛРС в ВЭЖХ и 1 ЛРС в ГХ используются в качестве СО **стандартизированные экстракты**. Они применяются в двух вариантах: 1) для идентификации СК с последующим КО их по одному или двум единым СО (*Пальми сереноа плоду*); 2) для идентификации СК и их КО (*Розторопши плоду*). Данное направление представляется очень перспективным и в настоящее время разрабатывается в ФЦ Украины.



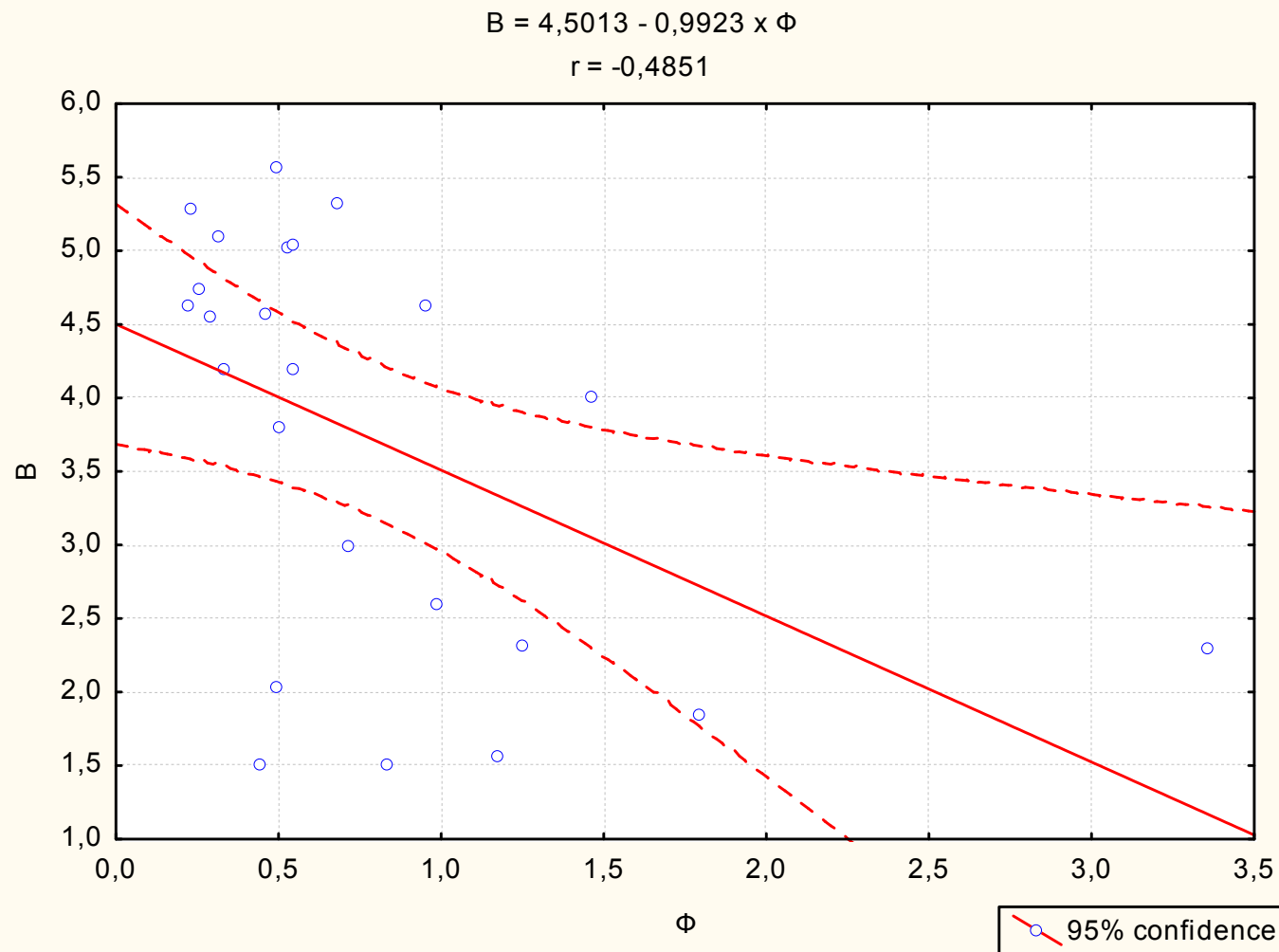
Сравнение различных фармакопейных методов КО ЛРС и суммарных препаратов-1

Проведенный анализ показывает, что только для эфирных масел КО (ГХ) формально ничем не отличается от КО комбинированных препаратов и поэтому коррелирует с БА. Для остальных суммарных препаратов (СП) КО носит условный характер и может мало коррелировать с БА.

Формально можно потребовать проведения корреляции БА с КО (БА-КО). Но на практике это выполнить невозможно, поскольку СП, за редким исключением (например, сердечные гликозиды), не обладают острым фармдействием, и поэтому различия в фармакологическом отклике для разных больных даже для одной и той же серии препарата могут достигать нескольких раз. Учитывая же и неопределенность связи условных концентраций с БА, различия между сериями будет еще большими. Такая клиника потребовала бы длительного времени и огромных затрат с не очень понятными требованиями к стандартизации исходных препаратов и неопределенными выводами.

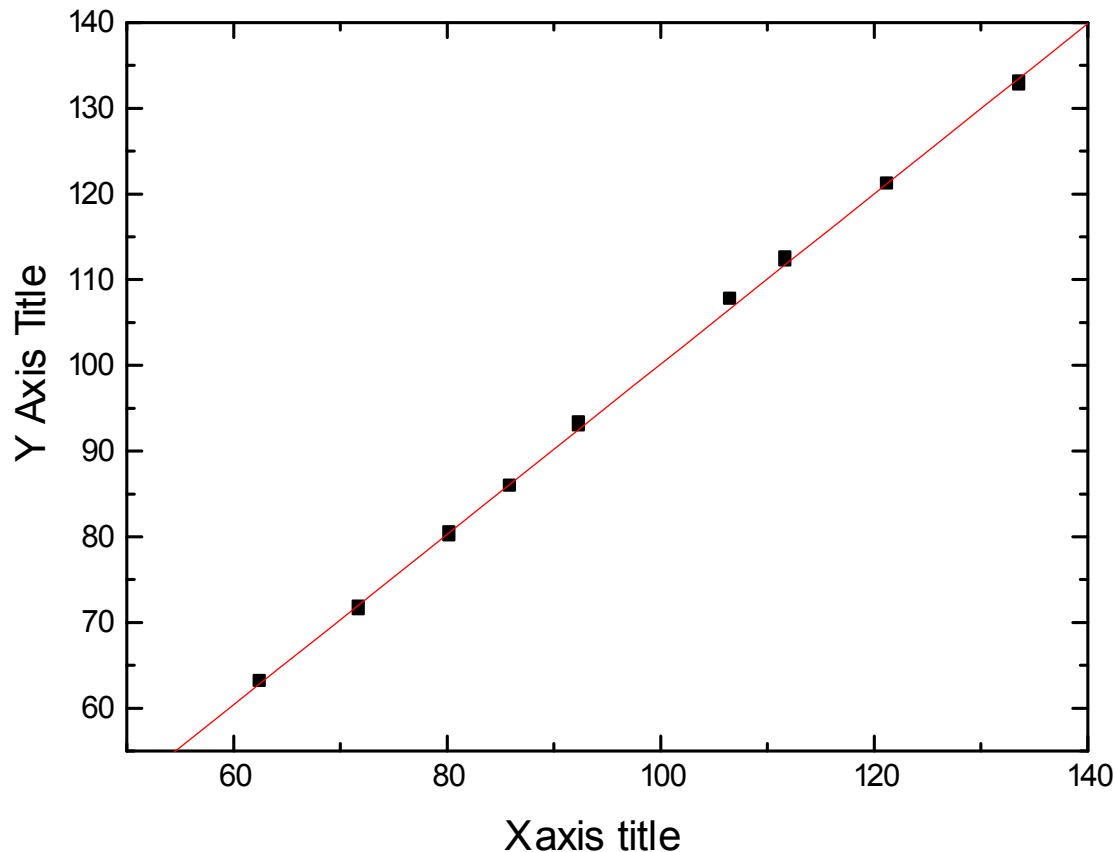


Зависимость тяжести судорог от содержания флавоноидов в экстрактах растений семейства пасленовых (Мищенко В.А., 2013), $B = 4.50 - 0.99 \cdot \Phi$, $R_c = -0.4851$



Линейная зависимость оптической плотности (Y) от концентрации АГХ (X) в нормализованных координатах
 $Y_i = 0.9937 \cdot X_i + 0.78, R_c = 0.9997$

Linear Regression Template



СВЯЗЬ биологической активности с условными концентрациями

Типичная экспериментальная корреляция тяжести судорог от содержания флавоноидов в экстрактах растений семейства пасленовых приведена на рисунке. Коэффициент корреляции ее (0.4851) статистически значимо отличается от нуля. Однако провести какие-то количественные оценки по такой корреляции невозможно, поскольку для одного и того же содержания флавоноидов БА может отличаться в 3.5 раза.

Для сравнения на следующем рисунке приведена типичная линейная зависимость оптической плотности от концентрации, полученная в нормализованных координатах при валидации методики КО таблеток амброксола г/х. Как видно, коэффициент корреляции данной зависимости (0.9997) просто несопоставим с коэффициентом корреляции (0.4851) БА-КО.

Поэтому корреляция БА-КО позволяет судить только о тенденциях, но не позволяет корректно выбрать группы соединений, с которыми коррелирует БА.



Сравнение различных фармакопейных методов КО ЛРС и суммарных препаратов-2

Поэтому правильнее рассматривать КО СП просто как **способ стандартизации**. С этой точки зрения, такие малоселективные испытания как **контроль экстрактивных веществ и сухого остатка** могут рассматриваться **только как дополнительные** к более селективным методам КО.

Контроль содержания эфирных масел является обязательным для эфиромасличных ЛРС, однако, для корректной стандартизации, данные методики контроля ЛРС **необходимо дополнять контролем содержания сигнальных компонентов** в выделяемом эфирном масле. Кроме того, эфирное масло не всегда полностью определяет БА ЛРС и должно дополняться другими методами КО.



Сравнение различных фармакопейных методов КО ЛРС и суммарных препаратов-3

Прямое КО суммы действующих веществ **гравиметрически** или **титрованием** носит **частный характер** и применимо лишь к ограниченному числу СП. Кроме того, в случае сильнодействующих веществ (сумма алкалоидов) для готовых СП целесообразно дополнительно вводить КО сигнальных компонентов (как это делается для эфирных масел).

Наиболее общим подходом к КО СП является определение условных концентраций действующих веществ в пересчете на целевое соединение. Основные методы – СФ и хроматография. Хроматография более селективна, а СФ проще. В общем случае, в подходе условных концентраций хроматография не имеет преимуществ перед СФ, применение которой более целесообразно.



Особенности СФ КО ЛРС и СП в методе условных концентраций-1

С точки зрения селективности, в СФ-анализе условных концентраций **предпочтительнее применение группового реактива**, чем СФ по собственному поглощению.

Невысокие требования к точности КО СП и возросший уровень спектрофотометров делают **перспективным применение метода показателя поглощения (МПП)**, что снижает проблему стандартных образцов.

Это требует обязательной квалификации спектрофотометра и мерной посуды, а также персонала, что особенно важно в условиях СНГ (это показывает опыт проведения ППТ).

Кроме того, непонятно, как валидировать данные методики, поскольку стандартизованные процедуры валидации пока не разработаны для СФ КО ЛРС вообще и для МПП, в



Особенности СФ КО ЛРС и СП в методе условных концентраций-2

В настоящее время разработаны стандартизованные процедуры валидации СФ-методик в варианте МПП для синтетических субстанций и готовых ЛС. Проведенный при этом анализ КО ЛС в фармакопейных монографиях на ЛРС показывает, что в ряде случаев фармакопейные требования к спектрофотометрам допускают неприемлемо большое различие в СФ КО для ряда ЛРС.

В частности, для плодов боярышника – 8.2%, пустырника – 8.0%, спорыша – 6.8%, хвоща стеблей – 6.5% и т.д.. А ведь еще есть неопределенность пробоподготовки, которая также очень значительна.

Поэтому применение МПП для СФ-методик КО ЛРС хотя и является стратегическим направлением, но требует еще большой научной проработки. В условиях СНГ пока более надежным можно считать применение метода стандарта.



Особенности хроматографического КО ЛРС и суммарных препаратов

Основным направлением развития КО СП является переход на хроматографический анализ сигнальных компонентов в варианте единого стандарта, что позволяет существенно улучшить защиту от фальсификации СП.

Однако применение такого подхода требует достаточной воспроизводимости компонентного состава препарата. Учитывая то, что GACP для ЛРС в Украине находится в стадии внедрения, такой воспроизводимости может и не быть, что снижает возможность применения сейчас метода сигнальных компонентов к отечественному ЛРС.

СФ-определение условных концентраций для отечественного ЛРС и препаратов из него может оказаться более приемлемым, чем метод сигнальных компонентов. Данный вопрос нуждается в экспериментальном изучении.



Стандартные образцы для КО суммарных препаратов

1. СФ-анализ. Стратегическое направление – отказ от СО и переход на МПП. Это требует надлежащей квалификации оборудования и разработки стандартизированной процедуры валидации СФ-анализа суммарных препаратов в варианте МПП.
2. ВЭЖХ и ГХ. Перспективными могут быть 2 варианта:
 - Разработка единых стандартов, которые могут и не входить в группу анализируемых компонентов.
 - Разработка стандартизованных экстрактов. Это упрощает как идентификацию целевых пиков, так и их количественное определение. При этом целесообразно приводит и хроматограмму этого экстракта (для информации).



Общие выводы и рекомендации

1. В состав ЛРС входит сложная смесь различных классов биологически активных соединений (БАС). Количественный (а иногда и качественный) профиль этих соединений может сильно различаться для разных регионов.
2. В разных регионах одно и то же ЛРС может использоваться для разного медицинского применения. Это связано как с различием профиля БАС в разных регионах, так и с национальными традициями.
3. Разное медприменение требует стандартизации в ЛРС содержания разных классов БАС. Так, в ЕС плоды шиповника рассматриваются как витаминное средство, поэтому в ЕФ это ЛРС стандартизуется по содержанию аскорбиновой кислоты. А, например, в Украине плоды шиповника традиционно используются также как источник каротиноидов и масла шиповника. Поэтому для Украина интересна стандартизация плодов шиповника именно по этим показателям.



Общие выводы и рекомендации

4. Наиболее эффективный способ стандартизации химического профиля ЛРС – это GACP. Однако, учитывая различные природные условия в разных регионах и различные традиционные условия сбора ЛРС, это может привести к разному химическому профилю ЛРС в разных регионах. Если же этот профиль стандартизовать, то ЛРС может просто перестать обладать той БА, которая является традиционной для данного региона.
5. В связи с этим, возникает общий вопрос о возможности создания единого международного фармакопейного стандарта качества для конкретного ЛРС, поскольку неопределенным является само понятие качества ЛРС. Так, плоды шиповника могут считаться качественными для целей получения каротиноидных препаратов, но браковаться по содержанию аскорбиновой кислоты, которое требует ЕФ. Такая ситуацию достаточно типична для Украины.
6. Один из способов решения такой проблемы – создания параллельных национальных монографий на ЛРС. Так, в ГФУ, параллельно с монографиями ЕФ на ЛРС, действуют и чисто национальные монографии на то же ЛРС.



Общие выводы и рекомендации

7. Второй способ решения этой проблемы – это рассматривать международные монографии (например, ЕФ) на ЛРС как **базовые**. Разные страны могут добавлять к ним свои национальные требования. Для этого надо определиться с тем, какие базовые требования должны входить в эти базовые монографии.
8. Стратегическими направлениями количественной стандартизации ЛРС и суммарных препаратов можно считать СФ в варианте **условных концентраций** и хроматографию в варианте **сигнальных компонентов** (маркеров).
9. СФ в варианте условных концентраций представляет собой КО какого-то класса БАС в пересчете на концентрацию какого-то соединения, принятого за стандартное. При этом БА различных соединений одного и того же класса может различаться в несколько раз. Например, антиоксидантное действие мирицетина и кемпферола в экстракте «Флакумин» (из скумпии). Аналогично, БА β -каротина в несколько раз выше БА других каротиноидов (а оптическая плотность каротиноидов пересчитывается именно на β -каротин).



Общие выводы и рекомендации

10. Поэтому **сумма условных концентраций** может мало коррелировать с каким-то типом БА и должна рассматриваться, в общем случае, только **как метод стандартизации**. Это означает, например, что если первая серия препарата имеет содержание суммы флавоноидов больше, чем другая серия этого препарата, то это не означает, что первая серия имеет большую БА. Может быть и наоборот.
11. Это ставит под сомнение корректность использования, в общем случае, «квантифицированных» экстрактов, т.е. экстрактов с некоторой стандартизованной суммой БАС. Некорректно разбавлять экстракт из ЛРС до некоторой стандартной суммы выбранного класса БАС, поскольку БА связана не только с этой группой БАС.
12. В случае экстрактов из ЛРС корректнее стандартизовать условия выращивания и сбора, т.е. применять GACP. Эффективность метода условных концентраций при этом увеличивается.



Общие выводы и рекомендации

13. Метод **сигнальных компонентов** (маркеров) предполагает обязательное выращивание ЛРС в условиях GACP. При этом наличие сигнальных компонентов в определенном диапазоне концентраций свидетельствует о том, что ЛРС выращивалось в условиях GACP и соответствует утвержденному стандарту. Отклонение от этого стандарта означает, что ЛРС выращивалось, собиралось или хранилось не в условиях GACP. При этом само ЛРС может быть вполне качественным для каких-то целей. Но его качество не гарантируется (аналог с обычными ЛС).
14. Применение метода сигнальных компонентов (маркеров) в международных фармакопейных монографиях требует разработки единого для всех стран стандарта качества ЛРС, что вызывает определенные сомнения.
15. Учитывая отсутствие обязательности GACP в странах СНГ, применение в таких условиях метода условных концентраций для стандартизации ЛРС в настоящее время может быть более надежным, чем метода сигнальных компонентов.
16. Полученные выводы используются для формирования национальной фармакопейной концепции качества ЛРС в Украине.



Литература

1. Гризодуб А.И., Евтифеева О.А., Проскурина К.И. Особенности фармакопейных подходов к количественному определению лекарственного растительного сырья и суммарных фитопрепаратов // Фармаком. – 2012. - № 3. – С. 7-30.
2. Котов А.Г. Фармакопейні аспекти стандартизації якості лікарської рослинної сировини і препаратів на її основі. - Дис... доктора фарм. наук 15.00.03 - стандартизація та організація виробництва лікарських засобів. – Харків, 2013. – 360 с.
3. Борщевский Г.И., Гризодуб А.И., Шевина В.Л. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения суммарных препаратов в варианте калибровочного графика // Фармаком. – 2013. - № 3. – С.24-33.
4. Гризодуб А.И., Евтифеева О.А., Проскурина К.И., Безумова О.В. Стандартизованная процедура валидации спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в варианте метода показателя поглощения // Фармаком. – 2014. - №1. – С. 29-39; - № 2. – С. 45-54.

