

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Фармакопейні стандартні зразки, як складова стандартизації лікарської рослинної сировини в Україні

ЮРЧЕНКО ТЕТЯНА ВАЛЕРІЇВНА

Інженер I кат. сектора «Експериментальна підтримка розробки монографій на ЛРС»

КОТОВ АНДРІЙ ГЕОРГІЄВИЧ

Нач.відділу ДФУ, д.ф.н., с.н.с.

КОТОВА ЕЛІНА ЕДУАРДІВНА

Керівник напрямку ДФУ «Лікарська рослинна сировина» Зав. сектором, К.фарм.н., ст.н.с.



Актуальність теми

З кожним роком до ДФУ додаються нові монографії на ЛРС та ЛРП, тому актуальним для обговорення питанням є стандартні зразки та їх види, які використовуються в цих монографіях. Фармакопейні стандартні зразки Державної Фармакопеї України (ФСЗ ДФУ) - стандартні зразки, атестовані уповноваженим фармакопейним органом України.

ФСЗ ДФУ атестують для використання у випробуваннях відповідно до монографій або загальних статей Фармакопеї та відповідно до специфікацій виробників.

У ДФУ як і в ЄФ в монографіях на ЛРС в методах контролю якості використовуються наступні види стандартних зразків:

- 1. Herbal drug reference standards (HDRS) - стандартні зразки ЛРС;
- 2. Herbal drug preparation reference standards (H DPRS) - стандартні зразки ЛРП;
- 3. Chemical reference standards (CRS) - хімічні стандартні зразки, індивідуальні сполуки.



Види стандартних зразків

Стандартні зразки ЛРС (HDRS) - проаналізовані достовірні зразки ЛРС (звільнені від сторонніх домішок). Такі стандарти в ЄФ спочатку передбачалося використовувати для мікроскопічної ідентифікації структурних компонентів, які характерні для певної ЛРС з метою підтвердження її ідентифікації, або позначення її присутності в лікарських рослинних засобах або готових ЛРП (ГЛРП).

Однак останнім часом цей вид стандартів активно використовується в монографіях ЄФ в ВЕРХ-методиках кількісного визначення для достовірної ідентифікації піків кількісних компонентів шляхом порівняння хроматографічного профілю випробуваного розчину і розчину HDRS (монографії «Coix seed», «Long pepper», «Orientvine stem», «Angelica dahurica root», «Belamcanda chinensis rhizome», «Eucommia bark»).

Стандартні зразки ЛРП (HDPRS) і хімічні стандартні зразки (CRS) - це хімічні стандарти, які використовуються для якісної і кількісної оцінки хімічних складових, або характерних, або таких, кількість яких має бути обмежена, або таких, які мають бути відсутні в конкретній ЛРС, ЛРП або ГЛРП.



Аспекти використання стандартних зразків ЛРС та хімічних стандартних зразків

- Компоненти, які кількісно оцінюються, можуть бути або активними, відповідальними за терапевтичну дію ЛРС/ЛРП/ГЛРП, або, якщо активні компоненти не визначені, можуть бути маркерами компонентів, характерних для ЛРС/ЛРП/ГЛРП, які можуть бути або можуть не бути хімічно схожі до будь-якого активного компоненту.
- Компоненти, які можуть бути кількісно оцінені, як правило, мають невеликий відсоток від загального вмісту біологічно активних сполук ЛРС/ЛРП/ГЛРП; часто, менше 1%;
- У багатьох випадках економічно утруднено використання індивідуальних хімічних речовин, які повинні бути кількісно оцінені;
- У деяких випадках кількісна оцінка, заснована на аналізі суми хімічних компонентів, бажаніше аналізу окремого компоненту;
- Бажано кількісно оцінювати однакові компоненти на кожному ступені ланцюга: ЛРС/ЛРП/ГЛРП;
- Дуже актуальне використання даних видів стандартів для якісної оцінки характерних компонентів ЛРС/ЛРП/ГЛРП.



Основні особливості використання стандартних зразків ЛРП та хімічних стандартних зразків

Стандартні зразки ЛРП (HDPRS) - це ЛРП, що отримуються в результаті переробки ЛРС, як правило, екстракцією, відповідні властивості яких визначені, і які вважаються придатними для використання в якості основного стандарту в запланованих цілях (наприклад, сухі екстракти і настойки.).

- При виборі СЗ, перевага має віддаватися **хімічним стандартним зразкам**, якщо це можливо (економічно в тому числі);
- Здатність специфічного компонента/ів, для оцінки яких ЛРП буде використовуватися в якості стандарту, бути достатньо стабільним (що особливо важливо для рослинних препаратів на основі водних розчинів етанолу, таких як настойка);
- Вміст зазначеного компонента/ів, для якого ЛРП буде використовуватися в якості стандарту, це не абсолютне значення, а присвоєне значення, яке визначається за допомогою визначеного методу;
- Часто неможливо перевірити присвоєне значення специфічного компонента/ів розрахунком балансу мас.

Хімічні стандартні зразки (CRS)

- Там, де це можливо, **хімічний стандартний зразок** рослинного походження повинен відповідати всім критеріям для синтетичних стандартних зразків;
- Там, де це неможливо, зокрема з урахуванням підтвердження присвоєного значення методом балансу мас, все одно краще мати первинний еталон, навіть якщо вміст у специфічного компонента/ів присвоєно значення нижче 80% м/м.



Потреба у використанні ФСЗ ДФУ для аналізу ЛРС

Для розробки ФСЗ рослинного походження та подальшого введення у монографію ДФУ, враховується затребуваність того чи іншого виду сировини на вітчизняному ринку та потреба виробників у придбанні ФСЗ для аналізу такої сировини, а також економічна доцільність питання у використанні європейських стандартів/ реактивів.

З огляду на надзвичайно високу вартість індивідуальних субстанцій, що використовуються в якості СЗ рослинного походження, ДП "Фармакопейний центр» проводить наступну політику: у всіх можливих випадках в якості ФСЗ ДФУ розробляються стандартизовані екстракти, які містять всі компоненти, що заявляються як маркери для даного виду ЛРС. Для визначення всіх регламентованих в методиці компонентів, достатньо однієї упаковки ФСЗ ДФУ. Їх використання дозволяє суттєво скоротити виробникам ЛРС витрати на аналіз сировини.

Каталог ФСЗ ДФУ містить 800 стандартних зразків, з яких 105 зразків, що використовуються для контролю якості ЛРС.



В монографіях на ЛРС та ЛРП використовуються такі види ФСЗ ДФУ:

1. ЛРС як СЗ (HDRS) представляють собою порошок , який одержують шляхом відбору (методом квартування) та подрібнення (відповідно до ДФУ 2.0, 2.9.12) сировини, напрацьовують із необхідної сировини при цьому відбирають кілька зразків сировини різних вітчизняних виробників, контролюють її відповідно до вимог ДФУ.

2. Стандартні зразки ЛРП (HDPRS)

Сухі екстракти HDPRS (напрацьовують із необхідної сировини при цьому відбирають кілька зразків сировини різних вітчизняних виробників, контролюють її відповідно до вимог ДФУ. Екстракт являє собою порошок, який одержують шляхом екстракції сировини органічними розчинниками (контролюють час екстракції, температуру та співвідношення сировина/екстрагент) із подальшим випарюванням розчинника (контролюють час випарювання, температуру у шафі).

Другий вид, екстракти, що розфасовані в ампули на стадії виробництва. Екстракти представляють собою в'язку масу, яку одержують шляхом екстракції сировини органічними розчинниками (контролюють час екстракції, температуру та співвідношення сировина/екстрагент) із подальшим дозуванням в ампули (контролюють однорідність дозування), упарюванням розчинника (контролюють час випарювання, температуру у шафі, середню масу вмісту ампул та відхилення від неї).

Третій вид СЗ ЛРП - це ефірні олії, що закупають у різних виробників України з сертифікатом якості або напрацьовують із сировини що пройшла вхідний контроль відповідно до вимог ДФУ.

3. Індивідуальні сполуки - речовини, або виділені з різних видів рослин або зовнішні стандарти, хімічні стандартні зразки (CRS).



Для Ідентифікації ЛРС та ЛРП використовують стандартизовані рослинні екстракти що розподіляють на 2 типи:

ФСЗ ДФУ екстракти, що розфасовані в ампули на стадії виробництва	ФСЗ ДФУ екстракти сухі
ФСЗ ДФУ Аронії чорноплідної екстракт	ФСЗ ДФУ Вовчуга екстракт сухий
ФСЗ ДФУ Барвінку екстракт	ФСЗ ДФУ Гібіску екстракт сухий
ФСЗ ДФУ Валеріани екстракт для ідентифікації	ФСЗ ДФУ Гінгко екстракт сухий
ФСЗ ДФУ Вільхи екстракт	ФСЗ ДФУ Календулозиди
ФСЗ ДФУ Дуба екстракт	ФСЗ ДФУ Конвалії екстракт сухий
ФСЗ ДФУ Ехінацеї блідої екстракт	ФСЗ ДФУ Лапчатки екстракт сухий
ФСЗ ДФУ Ехінацеї пурпурової екстракт для ідентифікації	ФСЗ ДФУ Меліси екстракт сухий
ФСЗ ДФУ Золототисячника екстракт	ФСЗ ДФУ Оргосифону екстракт сухий
ФСЗ ДФУ Калини екстракт	ФСЗ ДФУ Пасифлори екстракт сухий
ФСЗ ДФУ Конюшини лучної екстракт	ФСЗ ДФУ Пуерарії лопатевої коренів екстракт сухий
ФСЗ ДФУ Ліщини екстракт	ФСЗ ДФУ Розторопші екстракт сухий
ФСЗ ДФУ Малини екстракт	ФСЗ ДФУ Рутки екстракт сухий
ФСЗ ДФУ Моркви екстракт	ФСЗ ДФУ Сени екстракт сухий
ФСЗ ДФУ М'яти перцевої екстракт	ФСЗ ДФУ Цмину екстракт сухий
ФСЗ ДФУ Перстачу екстракт	ФСЗ ДФУ Якірців екстракт сухий



Стандартизовані рослинні екстракти, що використовують для ідентифікації ЛРС та ЛРП:

ФСЗ ДФУ екстракти, що розфасовані в ампули на стадії виробництва
ФСЗ ДФУ Подорожника екстракт
ФСЗ ДФУ Родовика екстракт
ФСЗ ДФУ Смородини екстракт
ФСЗ ДФУ Черемхи екстракт
ФСЗ ДФУ Чорниці екстракт
ФСЗ ДФУ Шипшини екстракт
ФСЗ ДФУ Шоломниці байкальської екстракт

Ефірні олії, що використовують для Ідентифікації ЛРС та ЛРП :

ФСЗ ДФУ Кминова олія
ФСЗ ДФУ Моркви ефірна олія
ФСЗ ДФУ Хмелю олія
ФСЗ ДФУ М'яти перцевої олія
ФСЗ ДФУ Базиліку олія

Стандартизовані рослинні екстракти, що використовують для Кількісного визначення ЛРС та ЛРП:

ФСЗ ДФУ екстракти	Метод
ФСЗ ДФУ Конвалії екстракт сухий	БКВ
ФСЗ ДФУ Меліси екстракт сухий	РХ
ФСЗ ДФУ Розторопші екстракт сухий	РХ
ФСЗ ДФУ Пуерарії лопатевої коренів екстракт сухий	РХ
ФСЗ ДФУ Ехінацеї пурпурової екстракт для кількісного визначення	СФ
ФСЗ ДФУ Цмину екстракт сухий	СФ
ФСЗ ДФУ Валеріани екстракт сухий	РХ



Індивідуальні сполуки (CRS), що використовують для Ідентифікації ЛРС та ЛРП:

ФСЗДФУ Арбутин	ФСЗДФУ Карвакрол	ФСЗДФУ Катехін
ФСЗДФУ Есцин	ФСЗДФУ Аргінін	ФСЗДФУ Кумарин
ФСЗДФУ Аймалін	ФСЗДФУ DL-Аспарагінова кислота	ФСЗДФУ Хлорогенова кислота
ФСЗДФУ Алантоїн	ФСЗДФУ Аскорбінова кислота	ФСЗДФУ Хлорфіліпт
ФСЗДФУ Агропіну сульфат	ФСЗДФУ Кофейна кислота	ФСЗДФУ Цинеол
ФСЗДФУ Цимарін	ФСЗДФУ Лейцин	ФСЗДФУ Азарон
ФСЗДФУ Елагова кислота	ФСЗДФУ Борнеол	ФСЗДФУ Пролін
ФСЗДФУ Франгулаемодин	ФСЗДФУ Лютеолін	ФСЗДФУ Елеутерозид В
ФСЗДФУ Фруктоза	ФСЗДФУ Левоментол	ФСЗДФУ Туйон
ФСЗДФУ Гліциретинова кислота	ФСЗДФУ 4-метилескулетин	ФСЗДФУ Ізоалантолактон
ФСЗДФУ Глюкоза моногідрат	ФСЗДФУ Олеанолова кислота	ФСЗДФУ Судан червоний G
ФСЗДФУ L-Глутамінова кислота	ФСЗДФУ Кверцетин	ФСЗДФУ Нафтоловий жовтий S
ФСЗДФУ Гваякол	ФСЗДФУ Резерпін	ФСЗДФУ Галова кислота
ФСЗДФУ Гваязулен	ФСЗДФУ Рутин	ФСЗДФУ Капсаїцин природний
ФСЗДФУ Гуайфенезин	ФСЗДФУ β - ситостерин	ФСЗДФУ Моноамонію гліциризат
ФСЗДФУ Гіперозид	ФСЗДФУ Тимол	ФСЗДФУ Ізовалеріанова кислота
ФСЗДФУ Ізосаліпурпозид	ФСЗДФУ Ононін	ФСЗДФУ Борнілацетат

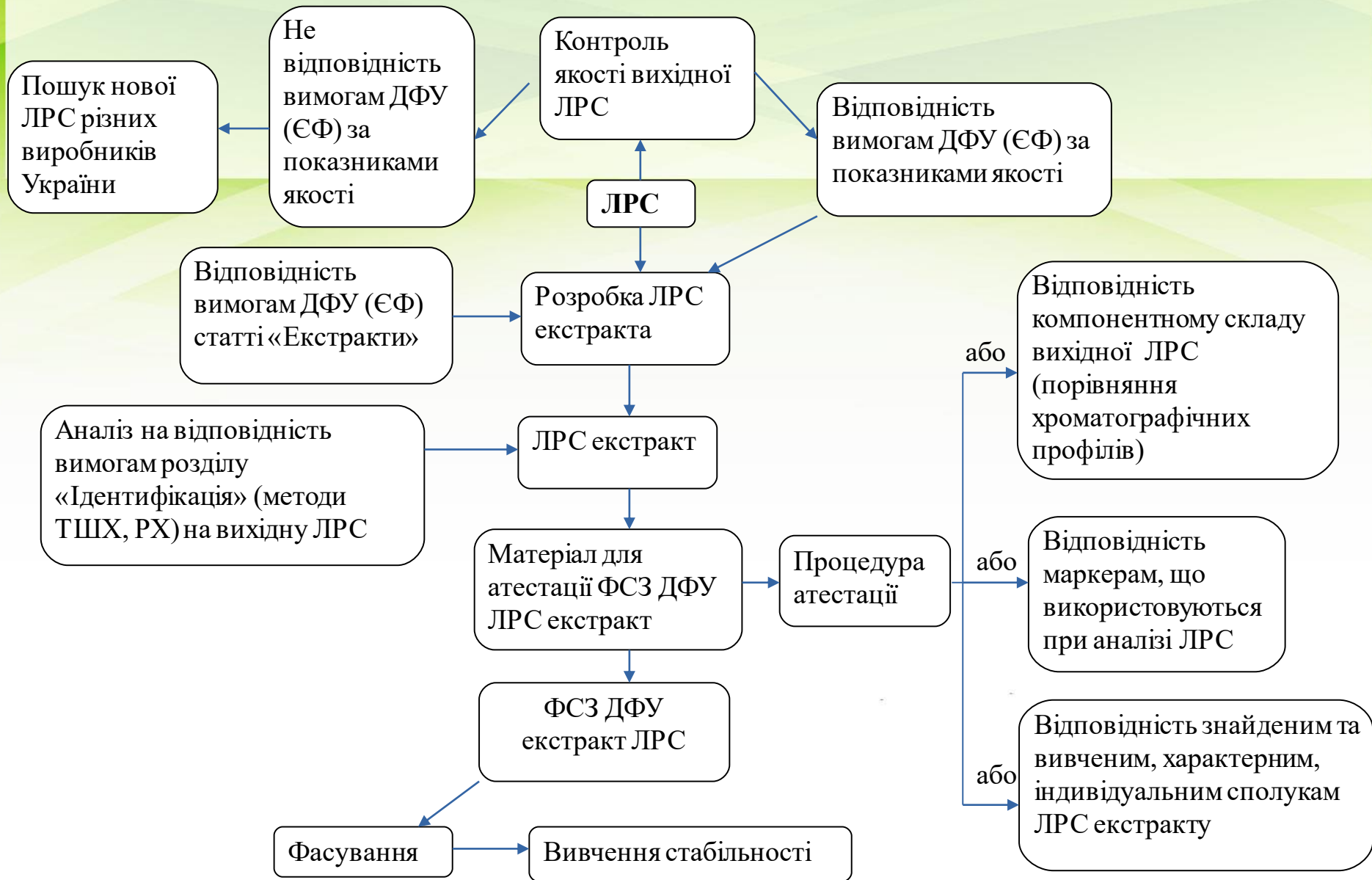


Індивідуальні сполуки (CRS), що використовують для Кількісного визначення ЛРС та ЛРП:

ФСЗ ДФУ Есцин	ФСЗ ДФУ Гваякол	ФСЗ ДФУ Ерізімін
ФСЗ ДФУ Дантрон	ФСЗ ДФУ Гуайфенезин	ФСЗ ДФУ Ферулова кислота
ФСЗ ДФУ Алантоїн	ФСЗ ДФУ Гіперозид	ФСЗ ДФУ Цинеол
ФСЗ ДФУ Арбутин	ФСЗ ДФУ Ізосаліпурпозид	ФСЗ ДФУ Цимарін
ФСЗ ДФУ Атропіну сульфат	ФСЗ ДФУ Келін	ФСЗ ДФУ Елагова кислота
ФСЗ ДФУ Цикорієва кислота	ФСЗ ДФУ Лютеолін	ФСЗ ДФУ Франгулаемодин
ФСЗ ДФУ Карвакрол	ФСЗ ДФУ Легоментол	ФСЗ ДФУ Рутин
ФСЗ ДФУ Кофейна кислота	ФСЗ ДФУ Кверцетин	ФСЗ ДФУ Пірогалол
ФСЗ ДФУ Діосгенін	ФСЗ ДФУ Резерпін	ФСЗ ДФУ Тимол
ФСЗ ДФУ Ізоалантолактон	ФСЗ ДФУ Кемпферол	



Алгоритм розробки та атестації для екстрактів ЛРС



Обов'язкові тести, що проводять при стандартизації ЛРС перед розробкою ФСЗ ДФУ рослинного походження :

- Ідентифікація А та В (макроскопія та мікроскопія);
- Ідентифікація С методом ТШХ (якщо ФСЗ ДФУ призначений для використання у випробуванні методом ТШХ);
- Сторонні домішки (ДФУ 2.8.2);
- Втрата в масі при висушуванні / Вода;
- Загальна зола / Зола нерозчинна в хлористоводневій кислоті;
- ТШХ - випробування на інші неприйнятні види рослин / або неприйнятні їх компоненти;
- Кількісне визначення (якщо ФСЗ ДФУ призначений для використання у випробуванні “Кількісне визначення”).

Обов'язковою умовою є відповідність обраних зразків ЛРС вимогам монографій ДФУ — ЄФ.

Екстракти, що отримують з ЛРС, мають відповідати вимогам загальної монографії ДФУ «Екстракти». Напрацьовані екстракти з ЛРС, містять комплекс БАР, серед яких присутні маркери, що використовуються в якості аналітичних або зовнішніх стандартів в розділах "Ідентифікація» та «Кількісне визначення» (приклади: меліси екстракт сухий, ехінацеї пурпурової екстракт для ідентифікації, ехінацеї пурпурової екстракт для кількісного визначення, розторопші екстракт сухий та ін).



Вивчення компонентного складу ФСЗ ДФУ методом РХ

Атестація ФСЗ ДФУ повинна проводитися відповідно до вимог загальної статті ДФУ 5.12, керівництва ISO «Загальні вимоги до компетентності виробника лікарських засобів», а також відповідно до внутрішньої документації Фармакопейного центру.

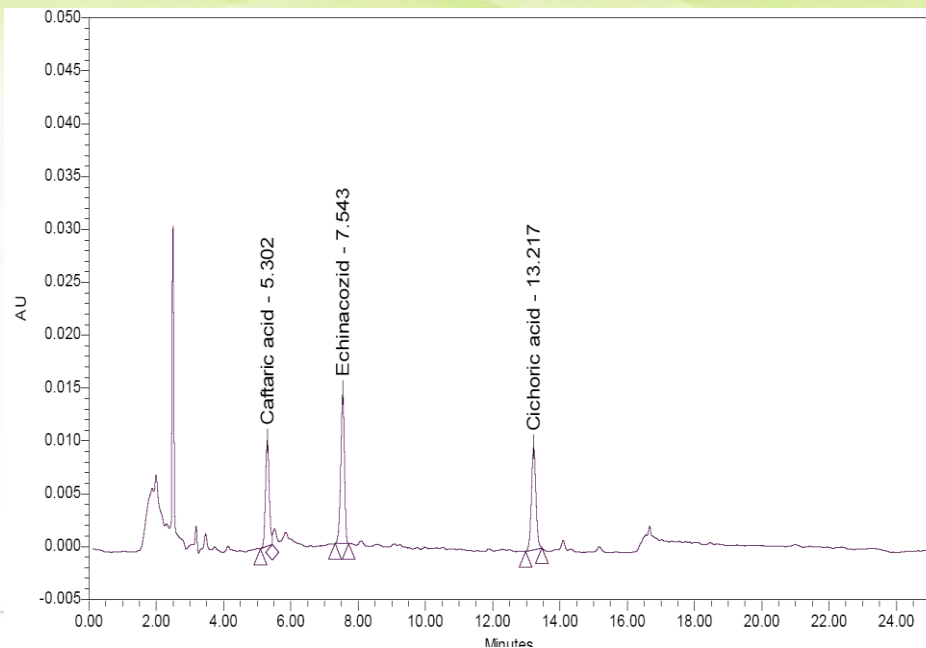
Для розробки та атестації ФСЗ ДФУ рослинного екстракту необхідно розглянути наступні питання:

- компонентний склад даного ФСЗ в умовах методик, в яких передбачається його використання (для підтвердження присутності необхідних компонентів застосовуються сертифіковані діючі речовини або маркери, або використовуються специфічні валідовані методики (ЄФ).

В якості прикладу етап розробки ФСЗ ДФУ ехінацеї блідої екстракт та вивчення його компонентного складу, що проводили методом РХ в умовах методик на вихідну сировину, відповідно монографій ДФУ—ЄФ.

Для ехінацеї блідої екстракту були отримані хроматограми, які відповідали вимогам, описаним у монографії ДФУ-ЄФ *Ехінацеї блідної корені*. Основним компонентом екстракту є ехінакозид, його вміст 0.3%.

ВЕРХ-хроматограма, отримана при вивченні хроматографічного профіля ФСЗ ДФУ *Ехінацеї блідої екстракт*.



Вивчення компонентного складу ФСЗДФУ методом ТШХ

Для ФСЗДФУ екстрактів призначених для методу ТШХ, основною умовою для ідентифікації компонентного складу атестованого екстракту є відповідність зон на хроматограмі, отриманій в умовах його використання, зонам що регламентуються, описаним для розчину порівняння і випробуваного розчину у відповідній методиці монографії ДФУ-ЄФ.

Наприклад:

- для ортосифона екстракта сухого при проведенні ідентифікації обов'язковим є наявність основної флуорисцюючої зони на рівні зони синенсетину (Рисунок 1);
- для валеріани екстракта для ідентифікації при проведенні ідентифікації обов'язковим є наявність основної фіолетової зони на рівні зони валеренової кислоти (Рисунок 2);
- для золототисячника екстракта при проведенні ідентифікації обов'язковим є наявність основної зони поглинання свертіамарину на рівні зон поглинання свертіамарину на хроматограмі розчину порівняння за довжини хвилі 254 нм; за денного світла обов'язковим є наявність основної коричнювато-сірої зони свертіамарину на рівні зон свертіамарину на хроматограмі розчину порівняння (Рисунок 3).

Хроматограми ФСЗДФУ екстрактів призначених для методу ТШХ:

Рисунок 1
365 нм



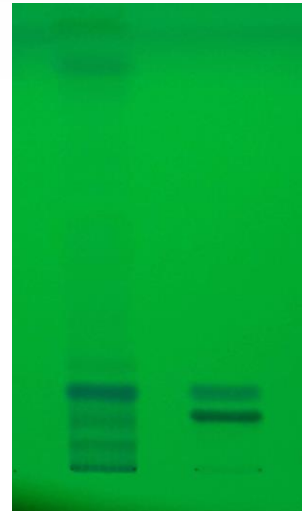
ФСЗДФУ Синенсетин
Ортосифону
екстракт сухий

Рисунок 2
денне світло



ФСЗДФУ Валеріани Валеренова
екстракт кислота

Рисунок 3
254нм



ФСЗДФУ Свртиамарин
Золототисячника Рутин
екстракт

денне світло



Наступні етапи розробки:

- вибір концентрації рослинного екстракту і / або його розведення до робочої концентрації перед використанням у методиці;
- розробка пробопідготовки для даного ФСЗ, що повинна забезпечувати отримання коректних і відтворюваних результатів;
- однорідність даного ФСЗ (для перевірки використовують не менше 3 зразків);
- стабільність даного ФСЗ (вивчається протягом року);
- фасування ФСЗ, умови зберігання, маркування.

Вибір концентрації рослинного екстракту і / або його розведення перед використанням в методиці. При виборі концентрації зразка, що атестується в першу чергу, враховували відповідність інтенсивності обов'язкових зон на хроматограмі його розчину, зонам, що регламентуються відповідною монографією ДФУ-ЄФ для розчину порівняння і випробовуваного розчину.

Приклад: Для встановлення концентрації ехінацеї блідої екстракту: враховуючи, що даний ФСЗ передбачає використання замість ехінакозиду, концентрація розчину повинна бути такою, щоб на хроматограмі інтенсивність зони відповідної ехінакозиду, відповідала б інтенсивності відповідної зони на хроматограмі розчину порівняння, описаної в ДФУ-ЄФ. На Схемі представлено опис зон, що регламентуються монографією ЄФ та зон, отриманих при хроматографуванні *ФСЗ ехінацеї блідої екстракту*, що атестується в умовах проведення випробування «Інші види *Echinacea* та *Parthenium integrifolium*».



Схема розташування зон на тонкошаровій хроматограмі ФСЗ ехінацеї блідої екстракту в умовах проведення випробування «Інші види *Echinacea* та *Parthenium integrifolium*»

Верхня частина пластинки		
кофейна кислота: інтенсивно синя флуорисцююча зона	слаба синє-зелена флуорисцююча зона	інтенсивна синє-зелена флуорисцююча зона
цинарин: інтенсивна зеленувата флуорисцююча зона	слаба синя флуорисцююча зона	синя флуорисцююча зона
ехінакозид: інтенсивна зеленувата флуорисцююча зона	інтенсивна зеленувата флуорисцююча зона (ехінакозид)	
Розчин порівняння ЄФ	Розчин ФСЗ ДФУ ехінацеї блідої екстракт	Випробовуваний розчин ехінацеї пурпурової корені

В результаті серії експериментів, була обрана концентрація зразка, що атестується ехінацеї блідої екстракту 0.003 г в 0.2 мл метанолу при нанесенні 10 мкл розчину на хроматограму у випробуваннях: «Ідентифікація та Інші види *Echinacea*».



Етапи розробки:

Розробка пробопідготовки для ФСЗ екстрактів, що атестуються, яка повинна забезпечувати отримання коректних і відтворюваних результатів.

При розробці пробопідготовки для ФСЗ, що атестується, брали до уваги, щоб використовувані прийоми (а саме розчинники / їх кількість, час екстрагування, спосіб екстрагування і т.д.) забезпечували б, по-перше, екстрагування ідентифікованих компонентів в необхідних концентраціях, а по-друге - отримання відтворюваних результатів при хроматографуванні. В результаті для ФСЗ ехінацеї блідої екстракту була обрана процедура обробки екстракту метанолом при використанні ультразвукової бані.

Однорідність ФСЗ екстрактів.

Для вивчення однорідності ФСЗ екстрактів, що атестуються, беруть 3-5 різних розфасованих ампул і з ними проводять паралельні випробування. При хроматографуванні всіх проб, видимих відмінностей не має бути виявлено. Однорідність потрібно вивчати для наважки не менше, ніж в методиці аналізу, в який використовується СЗ.

Стабільність ФСЗ екстрактів.

Вивчення стабільності ФСЗ, що атестуються проводили протягом 1 року. Відзначено, що ФСЗ не змінює агрегатний стан при зберіганні, та при хроматографуванні зони речовин - маркерів залишаються незмінними.

Фасування ФСЗ, умови зберігання, маркування.

Вивчено гігроскопічність екстрактів ехінацеї, встановлено, що екстракти гігроскопічні. Рекомендовано ФСЗ фасувати в ампули, що забезпечує запобігання поглинання вологи і збереження його в незмінному вигляді протягом терміну придатності. В одній ампулі міститься кількість екстракту, достатню для проведення аналізу. ФСЗ зберігають у захищеному від світла та вологи місці за температури від +2°C до +8°C, яка є загальноприйнятою для екстрактів і встановлена в результаті проведених досліджень.



Приклад атестації ФСЗ ДФУ екстрактів для кількісного визначення

У якості матеріалу для атестації ФСЗ ДФУ був використаний Валеріани екстракт сухий виробництва «Biosearch S.A.» Іспанія, що має сертифікат аналізу виробника.

Враховуючи дані листа призначення, де вказані всі показники якості в яких використовується ФСЗ ДФУ Валеріани екстракт сухий з допустимими межами вмісту діючої речовини, розраховується максимально допустиму невизначеність вмісту $\Delta RS \leq 2.0\%$. Незначущість по відношенню до невизначеності не повинна перевищувати 0,65%.

Атестацію зразка проводили в умовах монографії ДФУ 2.2 Валеріани екстракт водно-спиртовий сухий та виконували наступні іспити:

- «Гігроскопічність» в умовах ДФУ 2.0 (5.11);

За результатами визначення Валеріани екстракт сухий *розливається у поглиненій із повітря волозі*. Цей результат змінює підхід до атестації, тому що усі подальші випробування потрібно виконувати із розфасованого в ампули матеріалу для атестації.

Фасування виконували у спеціальному приміщенні із вологістю повітря не більше 30%, наважку 0,5 г (кількість така як у стандарта ЄФ) поміщали в ампули та кожну 5-ту ампулу відбирали для аналізу «Однорідність».

- «Вода метод К. Фішера»;

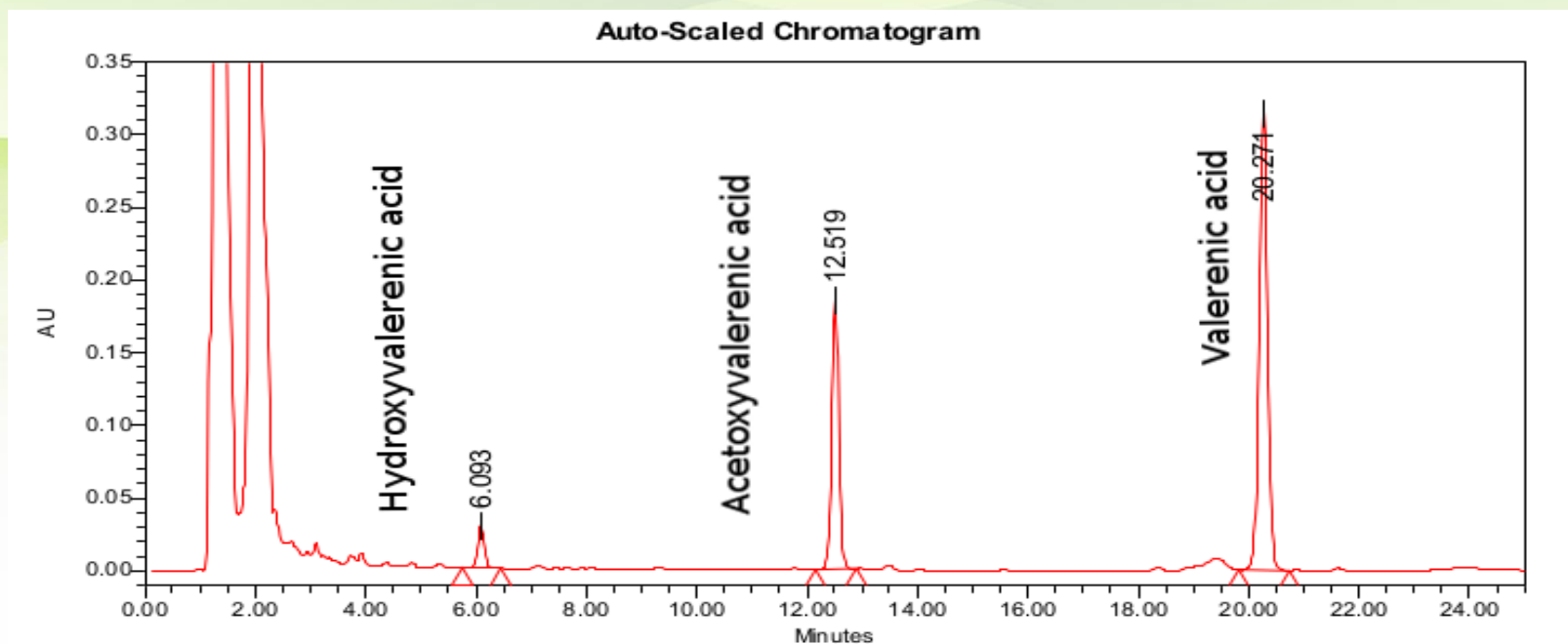
Визначення води проводили із 3-х паралельних наважок in bulk та вмісту 3-х розфасованих ампул, результати порівнювали при цьому різниця не повинна була перевищувати невизначеність аналізу. Такий підхід дає можливість перевіряти зміни в процесі зберігання.

- «Кількісне визначення» рідинна хроматографія.

Кількісне визначення та Однорідність вмісту перевіряли із відібраних ампул в умовах описаних для кількісного визначення. Для аналізу готували 5 незалежних випробовуваних розчинів валеріани екстракту сухого та 2 розчину порівняння Valerian dry Extract HRS.



Хроматограма ФСЗ ДФУ Валеріани екстракту сухого отримана методом РХ:



За результатами однорідності $\Delta\text{Unit} = 0.74\%$ та не перевищує максимальну допустиму невизначеність аналізу $\Delta\text{RS} = 2.04\%$. Валеріани екстракт сухий однорідний за умови зберігання в ампулах.

Встановили вміст валеренової кислоти 0.52% та вміст суми сесквітерпенових кислот 0.83% , що відповідає результатам вмісту вказаному у сертифікаті виробника 0.87% .

Як атестований вміст валеренової кислоти ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$) у валеріані екстракті сухом прийняли 0.52% для кількісного визначення методом рідинної хроматографії. Невизначеність методу складає 1.05% та не перевищує припустиму невизначеність для ФСЗ ДФУ.



ЛРС як СЗ - ботанічні зразки ЛРС (HDRS)

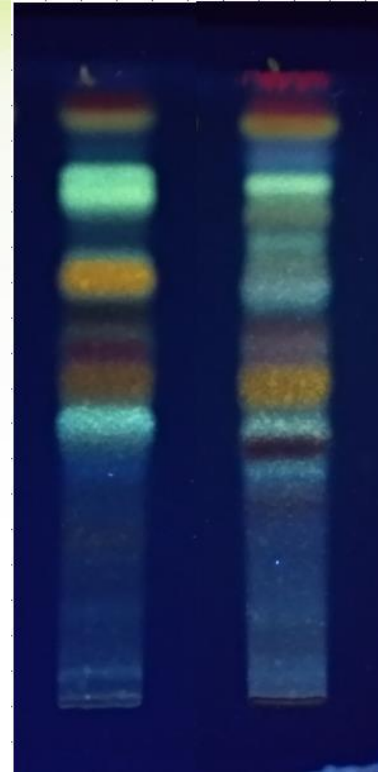
ФСЗ ДФУ хвощ болотний, що використовуються в монографії ДФУ для контролю домішки іншого, не фармакопейного виду сировини та ФСЗ ДФУ Череда поникла, що сама являється домішкою для фармакопейного виду сировини.

Ці зразки представлені у вигляді порошку, який одержують шляхом відбору (методом квартування) та подрібнення (відповідно до ДФУ 2.0, 2.9.12) необхідної сировини, при цьому відбирають кілька зразків сировини різних вітчизняних виробників та контролюють відповідно до вимог ДФУ, а саме: Ідентифікація макро- та мікроскопія, тонкошарова хроматографія; Випробування - Сторонні домішки, втрата в масі при висушуванні.

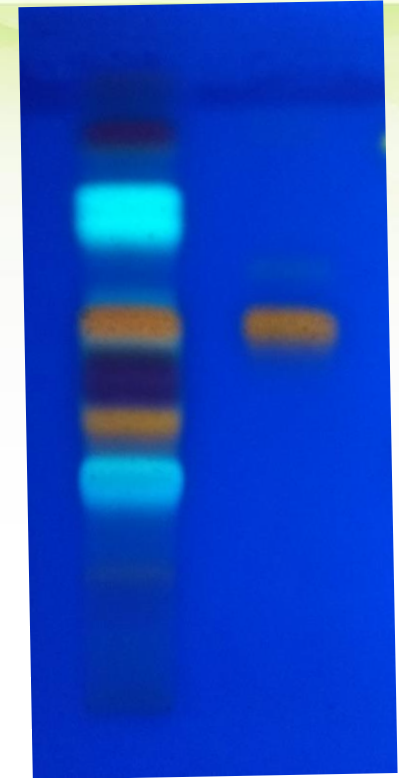
Ці зразки призначені для використання у випробуванні «Ідентифікація» методом ТШХ, тому атестацію проводять в умовах методик ДФУ де використовуються СЗ для розчину порівняння. Отриманий профіль хроматограми порівнюють із зонами описаними у розділі Результати для розчину порівняння та випробовуваного розчину.

Приклад: На хроматограмі випробовуваного розчину Череди (трироздільна) трава в нижній частині верхньої третини хроматограми не має виявлятися інтенсивної жовтої флуорисцюючої зони на рівні відповідної зони на хроматограмі розчину ФСЗ ДФУ Череди пониклої, яка відповідає зоні кверцитрину та являється діагностичною саме для Череди пониклої (*V.cernua*).

Хроматограма ФСЗ ДФУ Череди пониклої та Череди трава, отримана при проведенні випробування



ФСЗ ДФУ Череда поникла
Череда трироздільна трава



ФСЗ ДФУ Череда поникла
Кверцитрин поникла



Індивідуальні сполуки (CRS)

Речовини, виділені з рослин - індивідуальні сполуки (CRS), що використовуються в якості активних маркерів або зовнішніх стандартів в розділах "Ідентифікація» та «Кількісне визначення» (кумарин, арбутин, рутин, гіперозид, лютеолін). Такі ФСЗ є первинними.

Індивідуальні сполуки (CRS) можуть бути такі, що використовуються для стандартизації ЛРС та ЛРП, але не є рослинного походження (зовнішні СЗ): ФСЗ ДФУ Пірогалол, ФСЗ ДФУ Нафтоловий жовтий S, ФСЗ ДФУ Судан червоний G.

Підходи, що використовуються при атестації ФСЗ ДФУ мають відповідати підходам провідних фармакопей Європи, Америки, Британії, ВОЗ та ISO.

В чому полягає атестація таких СЗ призначених для Ідентифікації :

- Оцінка матеріалу для атестації (виділений із сировини чи придбаний в якості реактиву із сертифікатом якості);
- Оцінка та розрахунок необхідної кількості для атестації;
- Визначення гігроскопічності (якщо речовина придбана в якості реактиву із сертифікатом якості);
- Атестація згідно з призначенням, відповідно до монографії або НД в якій СЗ використовується за всіма показниками, що описані в розділі "Ідентифікація";
- Якщо СЗ використовується для Ідентифікації методом абсорбційної спектрофотометрії в інфрачервоному діапазоні, необхідно експериментально перевірити відповідність ІЧ - спектра (достатньо підтвердити ідентичність та чистоту);
- Для СЗ призначених для використання у випробуваннях "Визначення хроматографічної чистоти", достатньо підтвердити ідентичність та хроматографічну чистоту.



Приклад: процедура атестації β -ситостерину



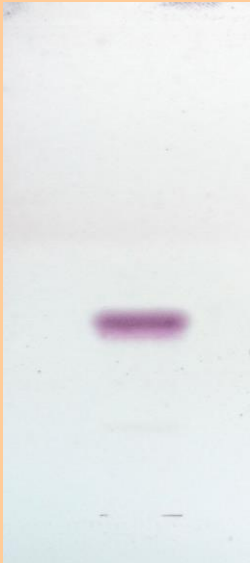
Атестація зразку проведена в умовах національних монографій ДФУ та виконані наступні іспити:

- 1) Ідентифікація ІЧ-спектр β -ситостерину, що атестується порівнюють зі спектром СЗ β -ситостерину);
- 2) Температура плавлення;
- 3) Підтвердження ідентифікації методом ТШХ та Підтвердження чистоти методом ТШХ в умовах монографій де використовується СЗ β -ситостерин.

Оскільки ФСЗ ДФУ β -ситостерин використовується в декількох монографіях, спочатку було проаналізовано умови хроматографування в них та концентрації стандарту, що наносить на пластину. В результаті було обрано 3 системи рухомої фази де він використовується і концентрації які є максимальними та в цих умовах проведено хроматографування атестуемого зразка. Вимогою для усіх хроматограм було наявність тільки однієї пурпурової зони β -ситостерину.

Приклади хроматограм ФСЗ ДФУ β -ситостерину при проведенні випробувань Ідентифікації та Підтвердження чистоти

Хроматограми ФСЗ ДФУ β -ситостерину, отримані при проведенні випробувань

Рисунок 1	Рисунок 2	Рисунок 3
		
СЗ β -ситостерин	СЗ β -ситостерин	СЗ β -ситостерин
Рухома фаза: <i>мурашина кислота безводна Р-циклогексан Р- етилацетат Р - толуол Р (0.9 -3 - 6 -24)</i>	Рухома фаза: <i>мурашина кислота безводна Р-вода Р- метанол Р- етилацетат Р (2.5 - 4 - 4 - 50)</i>	Рухома фаза: <i>етилацетат Р- толуол Р (30 - 70)</i>
Концентрація: 0.001 г в 5 мл <i>метанолу Р</i> Наносять 25 мкл	Концентрація: 0.02 г в 20 мл <i>метанолу Р</i> Наносять 10 мкл	Концентрація: 0.02 г в 10 мл <i>метанолу Р</i> Наносять 10 мкл

Атестація ФСЗДФУ (які є CRS) призначеного для випробування «Кількісне визначення»

Для ФСЗДФУ призначених для кількісних випробувань, атестованою характеристикою ФСЗ є вміст речовини, що визначається та зазвичай достатньо проводити наступні іспити:

- Підтвердження ідентичності;
- Визначення вмісту домішок;
- Кількісне визначення.

Процедура атестації:

Залежить від матеріалу для атестації (виділений із сировини чи придбаний в якості реактиву із сертифікатом якості).

- Оцінка та розрахунок необхідної кількості для атестації;
- Визначення гігроскопічності (якщо речовина придбана в якості реактиву із сертифікатом якості);
- Визначення однорідності (якщо речовина гігроскопічна). Для хімічно стійких і негігроскопічних субстанцій вивчення однорідності може не проводитися;
- Проведення ідентифікації методами: ІЧ - спектрофотометрія, ТШХ, РХ;
- Визначення домішок методами: ТШХ, РХ, втрата в масі при висушуванні, вода методом К. Фішера;
- Кількісне визначення методами: РХ, СФ, Титриметрія.
- Додаткові показники якості: температура плавлення (якщо описаний у НД згідно якої проводять атестацію).
- **Приклад процедури атестації ФСЗДФУ Гіперозиду для кількісного визначення.**

У зв'язку з тим, що субстанція гіперозид не описана в жодній провідній фармакопеї, атестацію проводили відповідно до внутрішньої документації ДП "Фармакопейний центр", СРМ 4-1.005 «Порядок проведення випробувань із контролю якості матеріалу для атестації гіперозиду», яку розробили користуючись даними описаними у статі ВФС 42-1088-81 на гіперозид стандарт та відповідно до СТП 1-2.01-14 «Процедура атестації фармакопейних стандартних зразків Державної Фармакопеї України».

Матеріал для атестації гіперозид не закупають, а виділяють із сировини в секторі експериментальної підтримки розробки монографій на ЛРС відповідно до внутрішньої документації у кількості достатній для атестації та продажу.



Процедура атестації:

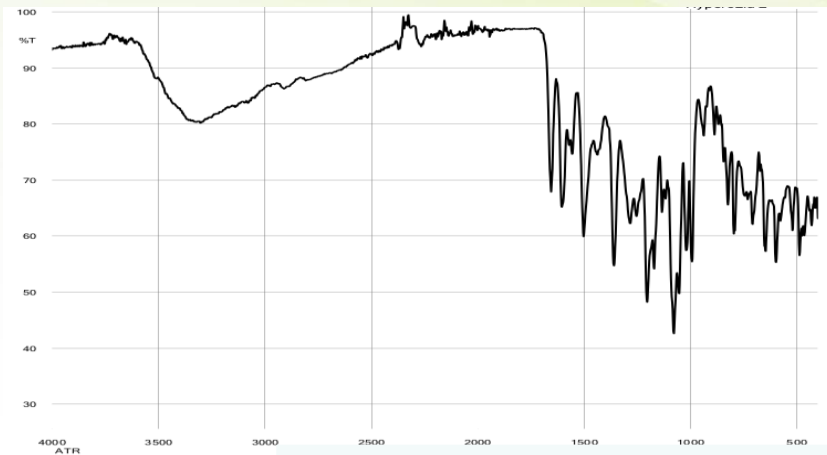
Випробування "Гігроскопічність" не проводять, бо в сертифікаті на ФСЗ ДФУ рекомендується проводити висушування перед використанням, показник гігроскопічність не є критичним.

Керуючись даними листа призначення, де вказані всі показники якості в яких використовується ФСЗ ДФУ Гіперозид з допустимими межами вмісту діючої речовини, розраховується максимально допустима невизначеність вмісту $\Delta RS \leq 2.0\%$. Незначущість по відношенню до невизначеності не повинна привишати 0,65%.

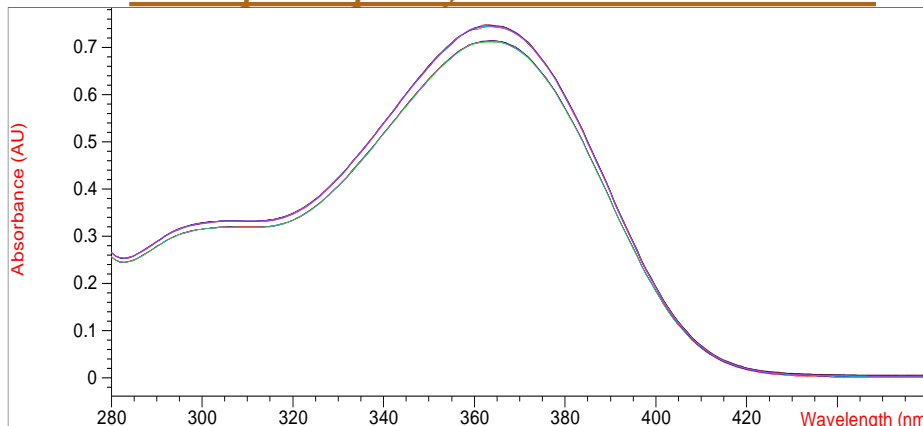
ІЧ-спектр ФСЗ ДФУ Гіперозиду

Відповідно до СРМ виконують наступні випробування:

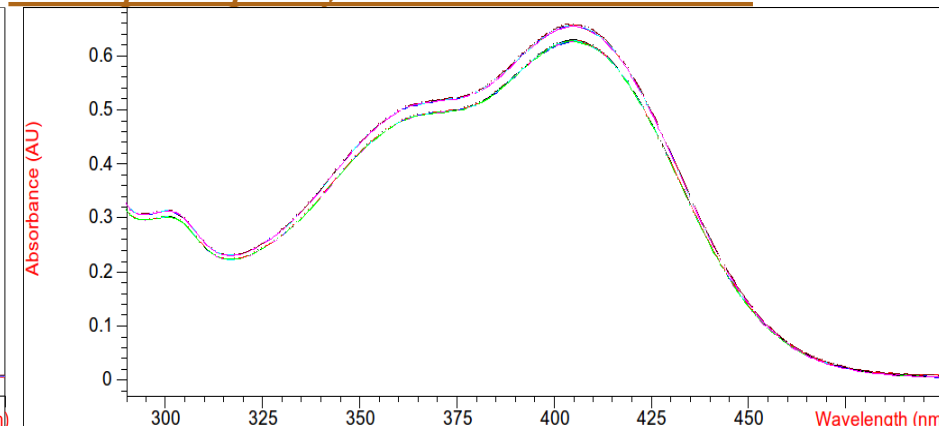
- «Ідентифікація» методом абсорбційної спектрофотометрії в інфрачервоному діапазоні (Отриманий спектр порівнювали зі спектром СЗ Гіперозиду);
- «Ідентифікація» методом рідинної хроматографії (проводили в умовах випробування "Супутні домішки");
- «Температура плавлення»;
- «Питомий показник поглинання» методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовому та видимому діапазоні;



Спектри гіперозиду за довжини хвилі 365 нм



Спектри гіперозиду за довжини хвилі 405 нм

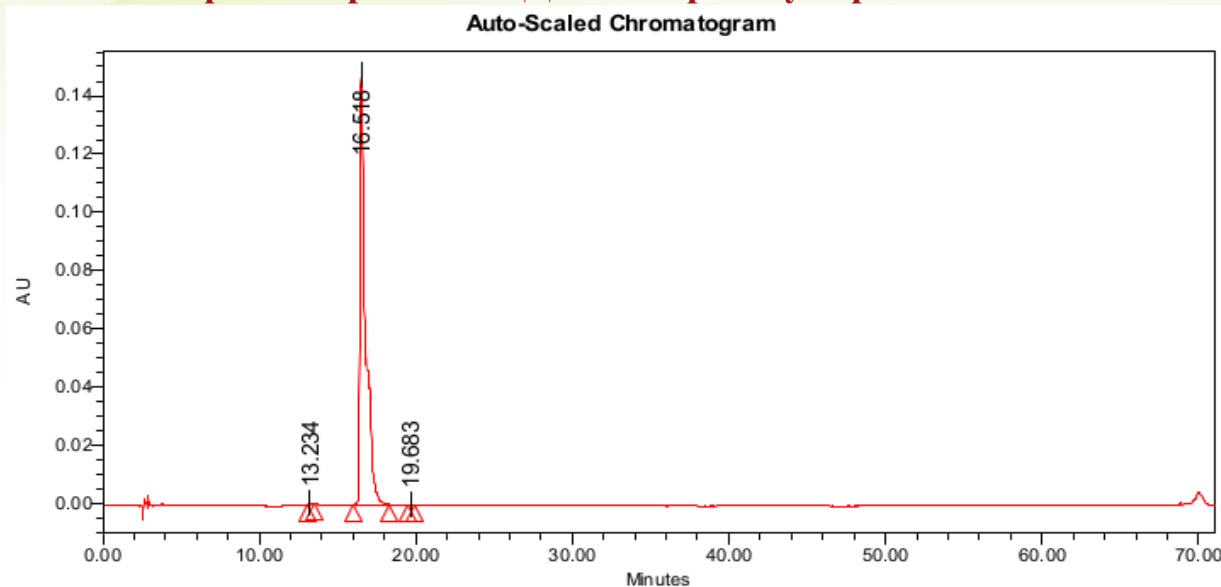


Процедура атестації:

- «Супутні домішки» методом рідинної хроматографії;
- «Втрата в масі при висушуванні»;
- «Кількісне визначення» методом комплексометричного титрування.

Вміст гіперозиду визначають методом вирахування домішок, які були підтверджені даними визначення методом титрування. Різниця між методами не має перевищувати припустиму невизначеність для ФСЗ ДФУ.

Хроматограма ФСЗ ДФУ Гіперозиду отримана методом РХ:



- Як атестоване значення для кількісного визначення у готових лікарських засобах прийняли вміст гіперозиду 99.5% для методу РХ, отриманий методом вирахування домішок, невизначеність методу становить 0.16% та не перевищує припустиму невизначеність для ФСЗ ДФУ. Атестоване значення вмісту гіперозиду для методу СФ в ультрафіолетовій та видимій областях становить 100%, а невизначеність методу 0.62% та не перевищує припустиму невизначеність для ФСЗ ДФУ.



Досьє на ФСЗ ДФУ:

- Перед початком атестації ФСЗ ДФУ, вивчається НД, де вказується призначення ФСЗ, перераховується вся документація де він описаний, яка при цьому використовується наважка та оформлюється Лист призначення;
- Аналітичний лист на вхідний контроль ЛРС з усіма показниками якості згідно з призначенням;
- Додатки до аналітичного листа/ протоколи аналізу показників якості ЛРС;
- Технічне завдання, де прописується призначення ФСЗ ДФУ та план атестації, а саме усі необхідні випробування, що підтверджують його використання;
- Паспорт небезпеки (вивчається перед проведенням випробувань);
- Протоколи аналізу на всі проведені випробування відповідними методами аналізу за ДФУ/ЕФ;
- Звіт з атестації/переатестації в якому надають усю необхідну інформацію за матеріалами атестації, призначення, присвоєння серії, результатами випробувань, терміном придатності та маркування;
- Після завершення випробувань та оформлення досьє, весь пакет документів передається до відділу валідації та стандартних зразків на рецензію, після чого правлений остаточний варіант досьє передається до архіву.

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ
з ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
ТА КОНТРОЛЮ ЗА НАРКОТИКАМИ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
«УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ
ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР
ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ»

STATE SERVICE OF UKRAINE
ON MEDICINES
AND DRUGS CONTROL
STATE ENTERPRISE
«UKRAINIAN SCIENTIFIC
PHARMACOPEIAL CENTER
FOR QUALITY OF MEDICINES»

61085, Україна, м. Харків, вул. Астрономічна, 33
www.sphu.org fso_ogf@ukr.net
+38 (099) 293-25-83; +38 (099) 180-06-01

33 Astronomichna Street, Kharkiv, Ukraine, 61085
www.sphu.org fso_ogf@ukr.net
+38 (099) 293-25-83; +38 (099) 180-06-01

Система менеджменту якості сертифікована на відповідність вимогам ДСТУ ISO 9001:2015

СЕРТИФІКАТ
на ФАРМАКОПЕЙНИЙ СТАНДАРТНИЙ ЗРАЗОК
ДЕРЖАВНОЇ ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ

№ 44-15987 від 29.06.21

ЗОЛОТОТІСЯЧНИКА ЕКСТРАКТ
CENTAURII EXTRACTUM

Хімічна назва згідно ІUPAC:	-
Ресстраційний номер CAS	-
Емпірична формула	-
Відносна молекулярна маса	-
Каталожний номер ФСЗ ДФУ	C0704
Серія №	7
Вміст в упаковці	0.005 г
Придатний до	06.2022
Опис	В'язка маса коричневого кольору
Умови довгострокового зберігання	У захищеному від світла місці за температури від + 2 °С до + 8 °С
Умови транспортування	За температури навколишнього середовища

Сфера застосування
Фармакопейний стандартний зразок Державної Фармакопеї України Золототисячника екстракт призначений для використання у випробуванні «Ідентифікація С» методом тонкошарової хроматографії відповідно до монографії ДФУ 2.1 «Золототисячник», національна частина.
Будь-яке інше використання ФСЗ ДФУ або інформації, яка наведена у даному сертифікаті, є виключно відповідальністю користувача.
ФСЗ ДФУ призначений для контролю якості лікарських засобів. ФСЗ ДФУ не є реактивом, дієчою добавкою, лікарським засобом, медичним засобом. ФСЗ ДФУ не призначений для споживання людиною та тваринами

Правила використання
Під час роботи з ФСЗ ДФУ необхідно дотримуватися вимог лабораторної практики, а також вимог охорони праці, безпеки та виробничої санітарії, що представлені в паспорті безпеки речовини (SDS)

Додаткова інформація
ФСЗ ДФУ атестовано відповідно до вимог ДФУ/Ph.Eur. 5.12 "Стандартні зразки" підходів ДФУ (5.12⁴) та згідно з основними положеннями ISO Guide 34

Заступник директора з наукової роботи,
начальник відділу валідації та стандартних зразків
С.І.І

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
«УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ
ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР
ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ»
№4 22617728
C0704
місто Харків



Висновки

Асортимент ФСЗ ДФУ рослинного походження розширюється з кожним роком, як за рахунок розробки стандартів для національних монографій на ЛРС, яка не описана в ЄФ, так і за рахунок практики розробки національних стандартів в разі коштовного європейського аналога.

Підходи до атестації ФСЗ ДФУ рослиного походження обумовлені різноманітними типами цих СЗ та використанням згідно з призначенням.

В залежності від складності атестації того чи іншого СЗ, удосконалюються і підходи до цієї атестації та обговорюються із рецензентами, що безсумнівно ставить ФСЗ ДФУ на рівні EP CRS.



ДЯКУЮ ЗА УВАГУ.

