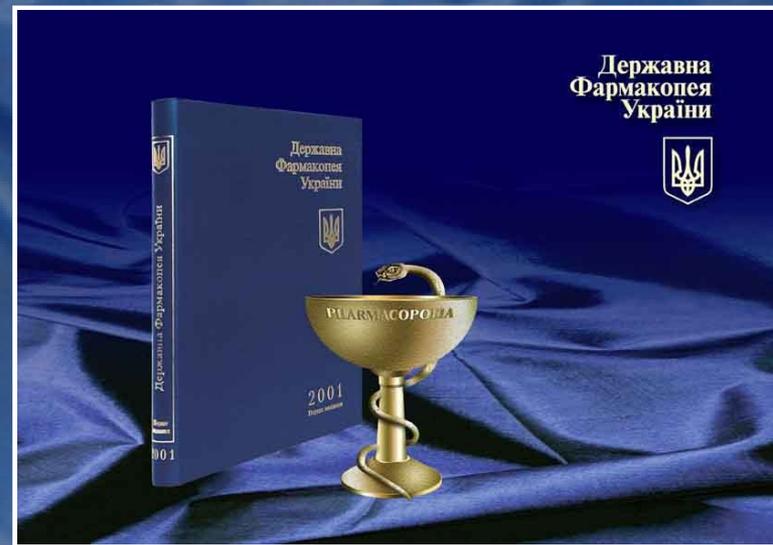


# Классификация фармакопейных подходов к количественному определению лекарственного растительного сырья и суммарных фитопрепаратов



**Гризодуб А.И., Евтифеева О.А., Проскурина К.И.**

***Фармакопейный центр***

***Национальный фармацевтический университет***

# 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.).



# Растительные суммарные препараты (СП) в ГФУ

В ГФУ описаны монографии на 100 наименований ЛРС и препаратов из него:

- 77 видов ЛРС,
- 11 эфирных масел,
- 12 настоек.



# Проблема стандартизации ЛРС

- 3-8 октября состоялся Юбилейный 100-летний Конгресс FIP, в рамках которого состоялось Сопещание Мировых Фармакопей.
- Целое заседание было посвящено стандартизации ЛРС. Особенно впечатляющим было выступление представителя Ирана, который показал, что один и тот же вид может иметь разный химический состав в зависимости от высоты, региона и страны.
- Так, мята перечная в Южной Америке содержит до 20% канцерогенного алкалоида и ее бояться даже брать в руки. А у нас – это лекарственное средство.
- Было высказано мнение, что единые фармакопейные требования к ЛРС из разных регионов лишают ЛРС их лечебного действия, которое характерно для каждого района.
- В Украине в основном дикорастущее ЛРС. Поэтому проблема его стандартизации является очень актуальной.



# Взаимосвязь биологической активности СП с концентрациями ДВ

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

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

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

$r_{ij}$  - 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.



# Комбинированные препараты

Нелинейные эффекты очень трудно предсказать, поэтому обычно полагают, что ими можно пренебречь, т.е.  $\Phi = 0$ . Тогда соотношение (1) 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  $P_i$  полностью определяется концентрациями ( $C_j$ ) ДВ. Устанавливая допуски для  $C_j$ , мы оцениваем БА препарата. Соотношение (2) - основа контроля качества комбинированных синтетических ЛС. Пример - «Цитрамон» - аспирин 0.24 г, парацетамола 0.18 г, кофеин 0.03 г + вспомогательные в-ва.



# Суммарные препараты (СП) - 1

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

$$P_{ip} = \sum_{j=1}^{j=m} C_{ij}^{KN} \times P_j + \sum_{j=m+1}^{j=M} C_{ij}^{UKN} P_j = P_i^{KN} + i_i^{UKN} \cdot n = 1 \dots , \quad (3)$$

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

Соотношение (3) не применимо на практике для количественного определения (КО) СП, поскольку парциальные величины  $p_{ij}$ , как для неизвестных ( $UKN$ ), так и для известных ( $KN$ ) компонентов, как правило, **неизвестны**.



# ЛРС в ГФУ: случаи отсутствия количественного определения

Поскольку растительное сырье (ЛРС) часто обладает несколькими видами БА, предложить для некоторых ЛРС методики КО, которые бы их учитывали, бывает иногда трудно. Поэтому в ГФУ **КО отсутствует в следующих 6 монографиях на ЛРС:**

- *Алтеї листя* (ГФУ 1.2, с. 347),
- *Бобівника трилистого листя* (ГФУ 1.2, с. 373),
- *Гвоздика* (ГФУ 1.2, с. 397),
- *Липи квітки* (ГФУ 1.2, с. 490),
- *Мирра* (ГФУ 1.4, с. 325),
- *Хмелю шишки* (ГФУ 1.3, с. 216).

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



# Классификация подходов к КО ЛРС и препаратов из него в ГФУ

Подходы к КО ЛРС и препаратов из него в ГФУ 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.



# Підхід 1. Контроль сумми концентрацій екстрагируемых компонентів

Самый простой и исторически первый подход.

**Допущение:** БА  $i$ -ого типа ( $P_i$ ) суммарного фитопрепарата обусловлена итоговой 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 в **5 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 с какой-то одной группой известных соединений ( $KN$ ) (флавоноиды и т.д.). 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 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 эфирных масел (ЭМ) в ЛРС – **18 монографий из 77 ЛРС**. Анализ проводится методом дистилляции и измерения объема отогнанного масла.

**Недостатки:** 1) Большинство ЛРС (59 видов) не имеет ЭМ.  
2) Разные компоненты ЭМ могут сильно различаться по БА, поэтому иногда надо дополнительно контролировать и соотношение компонентов в ЭМ – 3 ЛРС из 18 (пример, *Материнка* – не менее 60% суммы карвакрола и тимола).  
3) БА ЛРС связана не только с ЭМ. Поэтому в 3 ЛРС из 18 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 **4 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 характеристики 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 **3 видов ЛРС** и одной настойки. Обычно это сумма алкалоидов (Беладонни *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).

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  $k_{jo}$  всех компонентов, а это, как правило, невозможно. Поэтому приходится принять допущение  $k_{jo} = 1$ , 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 соотношения (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 для КО суммарных препаратов – он описан для **34 видов ЛРС** из **100**, описанных в ГФУ. Применение СФ в этом случае имеет следующие основные особенности:

- **СФ по собственному поглощению** применяется только для **3 видов ЛРС** (пример - *Глоду плоди*);
- **Метод показателя поглощения (МПП)** применяется в **26 случаях** из 34 случаев СФ (пример – *Берези листя*);
- **Метод стандарта** используется значительно реже, в **13 случаях** из 34 (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 – 10 ЛРС.*
  - b. *Реакция с борной кислотой – 3 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 – 8 ЛРС.*
4. *Реакция с  $FeCl_3$  и  $MgAc$  - 6 ЛРС.*
5. *Определение суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на цикориевую кислоту – 4 ЛРС*
6. *Определение гидрохинон-производных в пересчете на арбутин – 1 ЛРС*
7. *Сумма сердечных гликозидов, в пересчете на дигитоксин – 1*
8. *Сумма алкалоидов, в пересчете на хелидонин – 1 ЛРС*
9. *Собственное поглощение – 3 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.

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 – 3).
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 подобно 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

1. Основной метод – ВЭЖХ с СФ детектором (19 из 23 ЛРС).
2. ГХ с ДИП – только для эфирных масел (3 ЛРС из 23).
3. Многоволновая СФ - 1 ЛРС - как исключение.
4. Чаще всего проводится КО одного СК (11 ЛРС). Реже - два СК (9 ЛРС). Анализ трех СК для 2 ЛРС. Четыре СК - для 1 ЛРС.
5. КО, как правило, проводится методом стандарта. Только в одном случае используется метод калибровочного графика, а в 1 ЛРС на эфирное масло используется ГХ в варианте внутренней нормализации.
6. Обычно (13 ЛРС из 23) используются СО СК.
7. Для 9 ЛРС проводится стандартизация по одному соединению, на которое пересчитываются все другие. Данный подход можно считать наиболее перспективным.



# 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 КО с БА. Но фактически это выполнить невозможно, поскольку СП, за редким исключением (например, сердечные гликозиды), не обладают острым фармдействием, и поэтому такие клиника потребовали бы длительного времени и огромных затрат с не очень понятными требованиями к стандартизации исходных препаратов и неопределенными выводами.



# 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.



# Сравнение различных фармакопейных методов КО ЛРС и суммарных препаратов-4

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 Украины (учитывая опыт ППТ). Ситуация осложняется тем, что в настоящее время отсутствуют стандартизованные процедуры валидации СФ-методик в варианте МПП даже для синтетических ЛС, не говоря уже о суммарных. Данный вопрос требует научной проработки и сейчас решается.



# Сравнение различных фармакопейных методов КО ЛРС и суммарных препаратов-5

Основным направлением развития КО СП является переход на хроматографический анализ сигнальных компонентов в варианте внешнего стандарта, что позволяет существенно улучшить защиту от фальсификации СП. Однако применение такого подхода требует достаточной воспроизводимости компонентного состава препарата. Учитывая отсутствие в Украине GACP для ЛРС, такой воспроизводимости может и не быть, что снижает возможность применения такого подхода к отечественному ЛРС. СФ-определение условных концентраций для отечественного ЛРС и препаратов из него может оказаться более приемлемым. Данный вопрос нуждается в экспериментальном изучении.





**ПРИВЕТ  
ИЗ  
АМСТЕРДАМА!**