

Komentáře k analýze složení směsi flavonoidů v tabletách Diozen 500 mg metodou UHPLC

Jiří Slíva, Debora Karetová

Laboratorní analýza léčivého přípravku Diozen potvrdila složení flavonoidní směsi

Úvod

V léčbě chronické žilní nedostatečnosti a stejně tak i v léčbě hemoroidů se již řadu let bohatě uplatňují flavonoidy s příznivým ovlivněním struktury a funkce žilní stěny. Průkaz jejich terapeutické účinnosti lze dnes považovat za dostatečně podložený jak vlastní klinickou empirií, tak i relevantními klinickými studiemi s kvalitní metodikou i metaanalýzami. To je ostatně důvodem, proč jsou mnohé z těchto látek zmiňovány i ve stávajících doporučených postupech danou problematikou se zabývajících, a to jak českých, tak i zahraničních.

Pravděpodobně nejčastěji pojednávanou látkou je diosmin, o jehož oblíbenosti svědčí více než 600 publikací indexovaných v databázi Medline. Evropským lékopisem je definován jako směs flavonoidů, přičemž připouští přesně definovaný obsah samotného diosminu a ostatních flavonoidů. Diosmin jako takový musí splňovat minimálně 91,5% čistotu, avšak i další obsažené flavonoidy mají své limity. Nejčastěji uváděným je hesperidin (max. 4 %); dalšími jsou isorhoifolin a linarin (max. 3 % každé), diosmetin (max. 2 %), 6-iododiosmin (max. 0,6 %) a acetoisovanillon (max. 0,5 %) (1).

Vedle složení konkrétního léčivého přípravku je důležitá rovněž správně zvolená léková forma zajišťující dostatečné vstřebání, tj. základní předpoklad finálního terapeutického účinku. V klinických studiích i meta-analýzách proto selhává účinnost nemikronizované formy diosminu, zatímco flavonoidy v mikronizované formě mají tuto účinnost opakovaně prokazovánu.

Do uvedeném kontextu tak více než jen okrajově zapadá stávající více či méně plamenné diskuse stran superiority toho či onoho léčivého přípravku s obsahem mikronizovaného diosminu. Jak již bylo uvedeno výše, tento je jasně definován právě Evropským lékopisem, tj. je uvedeno i možné kvalitativně-quantitativní složení. Je tedy zřejmé, že přípravek Diozen, který je jedním z dnes nabízených léčivých přípravků s obsahem mikronizovaného diosminu jakožto účinné látky, kromě diosminu obsahuje právě i další mikronizované flavonoidy, v čele s hesperidinem.

Skutečné složení přípravku Diozen

Odpovědí, zda je dané konstatování pouhou floskulí nebo skutečností, budiž výsledky recentně provedené analýzy léčivého přípravku Diozen (Zentiva) Státním ústavem pro kontrolu léčiv certifikovanou společností

Quinta-Analytica. Zmíněný léčivý přípravek má ve svém SPC (Souhrn údajů o přípravku) jako účinnou látku uvedeno *Diosminum micronisatum* 500 mg. Závádá tak předpoklad, že přípravek obsahuje jen a právě syntetizovaný diosmin. Cílem zmíněné analýzy tak bylo především demonstrovat skutečné složení, tj. jasně definovat i přítomnost jiných flavonoidů a verifikovat, že je plně v souladu s Evropským lékopisem. Současně je takové složení prezentováno jako účinné ve stávajících doporučených terapeutických postupech.

K analýze byla využita vysoce citlivá a plně validovaná metoda ultra-vysoce výkonné kapalinové chromatografie (UHPLC). Provedeny byly vždy dvě paralelní přípravy vzorků náhodně zvolené šarže. Výsledky zachycuje tabulka a obrázek níže – viz Výběr informací a výsledků z laboratorního protokolu (2).

Diskuze a závěr

Analýza léčivého přípravku Diozen potvrdila, že vedle diosminu obsahuje i jiné flavonoidy (hesperidin, isorhoifolin, linarin a diosmetin), a sice v kvantitativním souladu s výše zmiňovaným Evropským lékopisem. Oproti referenčnímu přípravku obsahoval více primárně účinného diosminu i jeho aktivního metabolitu diosmetinu. Veškeré zjištěné substance splňovaly požadované limity a byly plně v souladu s Evropským lékopisem. Jestliže by se měl k lékopisu vztahovat i referenční přípravek, pak by tento výrazně limit hesperidinu překročil. Je známo, že diosmin je modifikovaný hesperidin (tj. je získáván procesem dehydrogenace z hesperidinu) a oba mají velmi podobný farmakologický účinek. Žádná relevantní data nalezená v publikované odborné literatuře nenaznačují aditivní nebo synergický účinek hesperidinu na diosmin, jakkoliv je předpokládán přínos všech obsažených flavonoidů.

MUDr. Jiří Slíva, Ph.D., Ústav farmakologie 3. LF UK, Praha

LITERATURA

1. European Pharmacopoeia. Diosmin. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&e-source=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwjFiebUjK_jAhVJSsAKHQctCK4QFjAAegQIA-RAC&url=http%3A%2F%2Fcdn.zhitiren.com%2Fuploads%2F1513840228%2FDiosmin_test_EP8.3.docx&usg=AOvVaw2HacGDz5zRMfZPZv5NicHm,4297-4298,22-1-2016.
2. Boublik M, Hoplicek L. Adoption of UHPLC method and evaluation of flavonoid mixture composition in Diozen 500 mg tablets. ANALYTICAL STUDY REPORT 2020; ASR-R-ZEN-GEN-021 A-20. 01.

ANALYTICAL STUDY REPORT**Výběr informací a výsledků z laboratorního protokolu***

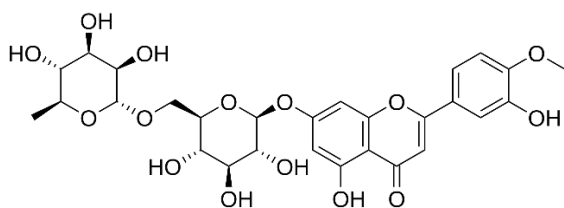
Analýza složení směsi flavonoidů v tabletách Diozen 500 mg metodou UHPLC

Číslo reportu: ASR-R-ZEN-GEN-021A-20.01

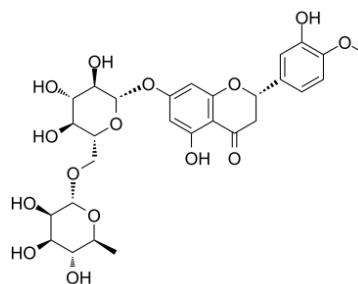
Datum vydání: 11. 12. 2020

Datum zadání: 19. 11. 2020

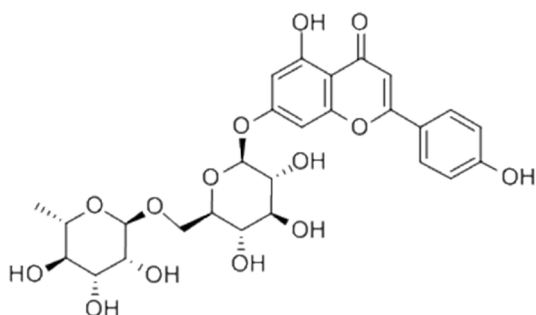
Kód projektu: ZEN-GEN-033

Struktury měřených flavonoidů

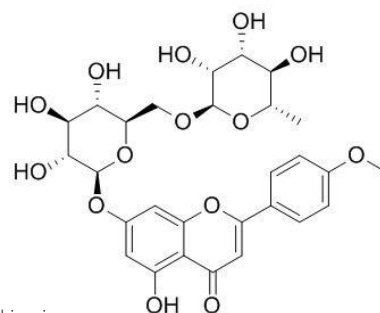
Diosmin $C_{28}H_{32}O_{15}$
Mw = 608.6 g/mol



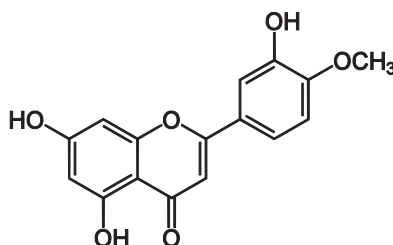
Hesperidin $C_{28}H_{34}O_{15}$
Mw = 610.2 g/mol



Isorhoifolin
 $C_{27}H_{30}O_{14}$
Mw = 578.5 g/mol



Linarin
 $C_{28}H_{32}O_{14}$
Mw = 592.5 g/mol



Diosmetin
 $C_{16}H_{12}O_6$
Mw = 300.3 g/mol

Vzorky a standardy

- Diosmin CRS, šarže: 7.0, Quinta kód: R1994/20; purity 87.7 %
- Hesperidin, šarže: LRAC5710, Quinta kód: R1974/20; purity 92.1 %
- Diozen 500 mg tablety, šarže: 75 27 29, Quinta kód: R1985/20; exp. 11/2022
- Diozen 500 mg tablety, šarže: 75 20 29, Quinta kód: R1986/20; exp. 05/2022

Material a metody

- Agilent Technologies 1290 infinity UHPLC system with column thermostat and UV detector with injector capable of 1 μ L injection volume
- analytical column: Acquity CSH C18, 1.7 μ m, 100 $\times$ 2.1 mm (Waters)
- analytical balance capable of reading to at least 0.01 mg
- ultrasonic bath
- laboratory centrifuge

Chromatografický systém

Analytical column: Acquity CSH C18, 1.7 μ m, 100 $\times$ 2.1 mm (Waters)

Guard column (optional): Guard column Acquity CSH or compatible

Flow: 0.3 mL/min

Column temperature: 40 $^{\circ}$ C

Autosampler temperature: 25 $^{\circ}$ C

Injection volume: 1.0 μ L

Detection wavelength: 283 nm

Detector scanning rate: $\geq$ 5 Hz

Total run time: 20 minutes

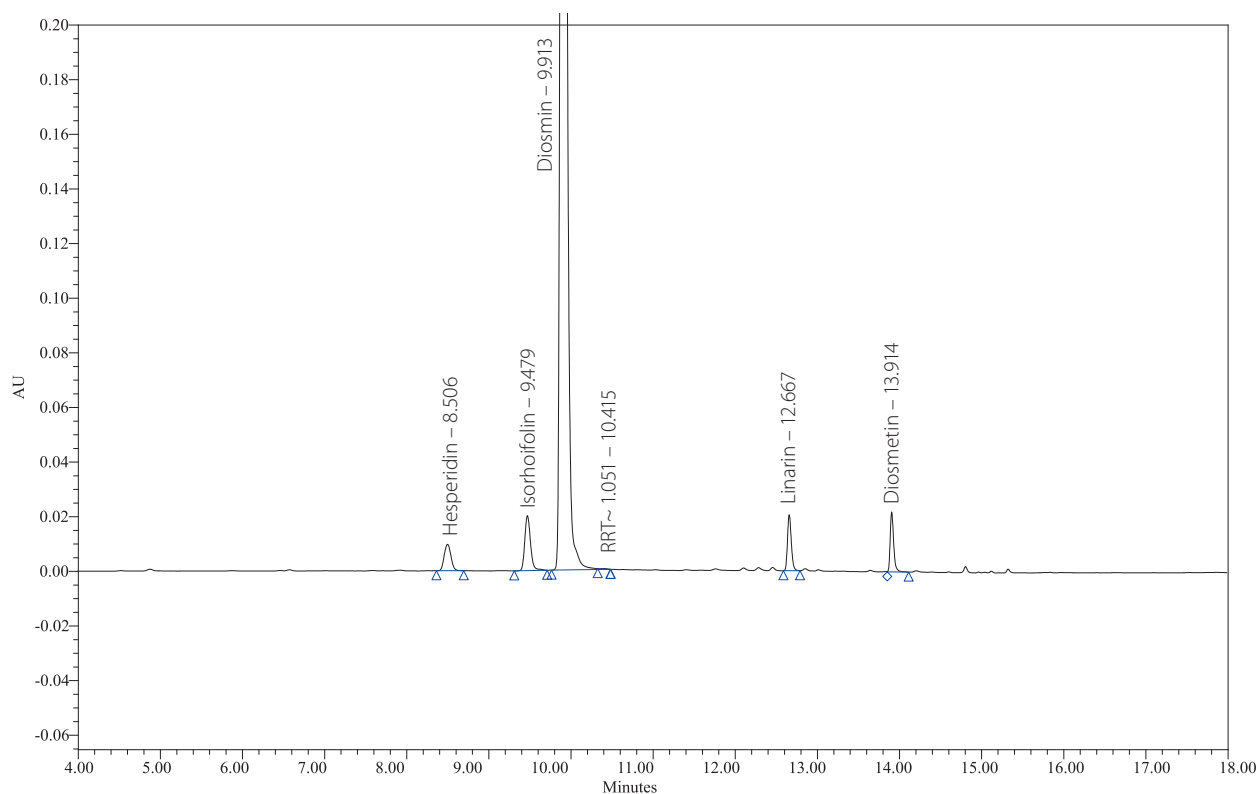
Mobile phase A: 10 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH = 2.3

Mobile phase B: methanol

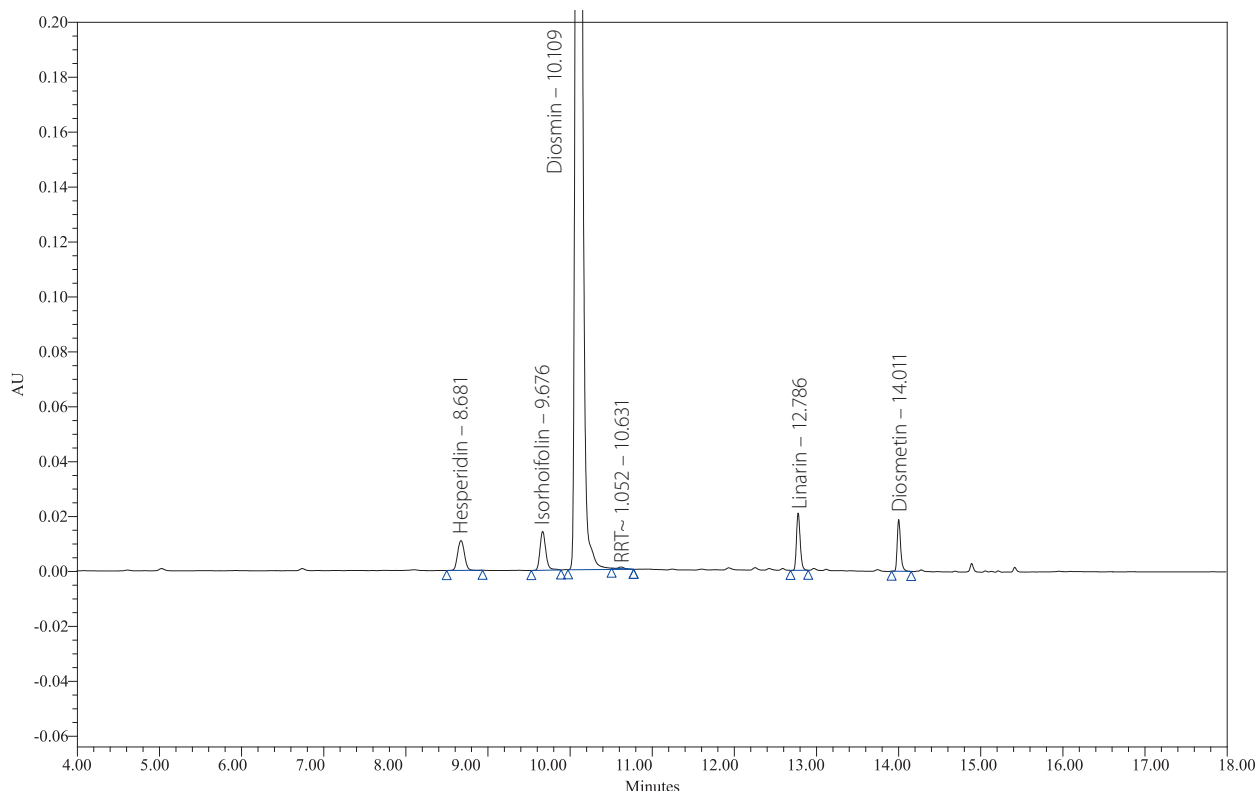
Výsledky složení tablet Diozen 500 mg (kvantitativně-kvalitativní složení přípravku)

Šarže č.	Quinta č.	Obsah (mg/tbl)				
		Diosmin	Hesperidin	Isorhoifolin	Linarin	Diosmetin
75 27 29	R1985/20	458.44	8.02	14.44	9.68	9.43
75 20 29	R1986/20	462.38	9.39	10.30	9.75	8.18

Chromatografický záznam složení tablety Diozen 500 mg (šarže č. 75 27 29)



Chromatografický záznam složení tablety Diozen 500 mg (šarže č. 75 20 29)



LEGENDA:

* výběr informací z protokolu ASR-R-ZEN-GEN-021A-20.01 (Quinta-Analytica)

UHPLC: druh vysokoúčinné kapalinové chromatografie

AU: signál detektoru (absorbance)

Venofarmaka s flavonoidy základem léčby chronického žilního onemocnění

Flavonoidy jsou biologicky velmi aktivní skupinou více než pět tisíc různých molekul rostlinné povahy. Zajišťují přirozenou ochranu funkce enzymů, vitaminů a dalších látek kontrolujících metabolismus. V potravě se vyskytují ve formě glykonu, absorbují se enterocyty po hydrolýze na aglykon. Diosmin je hydrolyzován na diosmetin, resp. hesperidin na hesperetin. Díky variabilní absorpci flavonoidů je k zajištění standardní dostupnosti nutná mikronizace. Mechanismus jejich působení je dán zakotvením do buněčných membrán, kde ovlivňují funkci membránových proteinů (enzymů, receptorů apod.). Významná je též úloha v kontrole exprese genů ovlivňujících obranné a reparační pochody. Z ovlivnění řady složek zánětlivého děje vyplývá jejich klinický význam. Dominantním klinickým účinkem je stabilizace

žilní stěny a pozitivní vliv na intersticiální děje. Která složka v účinku – tedy který flavonoid v tomto pochodu dominuje, nelze říci. Validní klinické studie byly prováděny vždy se směsí flavonoidů v rámci mikronizované flavonoidní frakce obsahující řadu složek (diosmin, hesperidin, linarin, isorhoifolin a diosmetin). Pro ně byl dobře doložen klinický účinek na ústup subjektivních příznaků, zlepšení kvality života a rychlejší hojení defektů (úroveň indikace 1 B v rámci mezinárodních doporučení). Otázkou velmi diskutovanou v současnosti je, jestli další na trh přicházející přípravky s obdobným složením jako MPFF mají stejné klinické účinky.

doc. MUDr. Debora Karetová, CSc.

II. interní klinika kardiologie a angiologie 1. LF UK a VFN, Praha