



A.a. 2014-2015

Michele Melegari – Lorenzo Di Maria

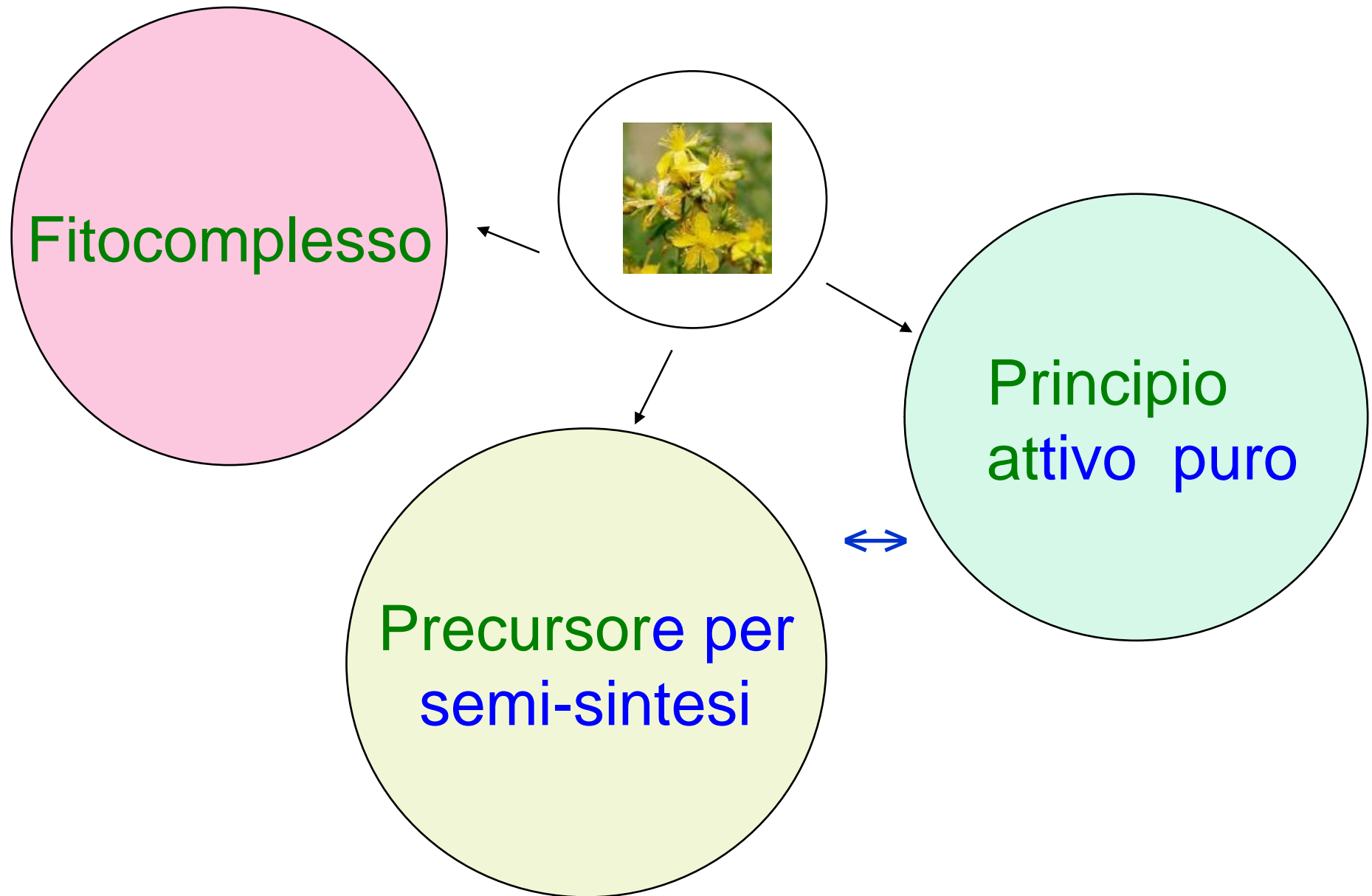
**FARMACI E INTEGRATORI DI ORIGINE VEGETALE
PROPRIETA', USI E ABUSI, PROBLEMI REGOLATORI**

8 maggio 2015

V° Lezione – M.Melegari

**Estratti Secchi Standardizzati e Titolati (ESST)
Caratteristiche, preparazione, protocolli**

Dalla **pianta medicinale** →...**farmaco!** ..**integratore!**



Il fitocomplesso comprende:

- **tutte** le sostanze presenti nella droga , complessivamente responsabili delle proprietà terapeutiche
- oltre ai principi attivi, anche sostanze inerti e/o regolatrici dell'attività farmacologica
- migliore efficacia, grazie alle sostanze che favoriscono l'assorbimento

L'E.S.S.T. può essere considerato un“fitocomplesso” ?

NON PROPRIAMENTE !

L' **E.S.S.T.** è....

- ottenuto da un “**fitocomplesso**”
- ha contenuto noto e definito di **p.a...**
- ..con **%** costante, uniforme....
- ...è controllato
-per lotto

ESTRATTO:

PREVEDE UNA ESTRAZIONE CON
SOLVENTE/I DA UN FITOCOMPLESSO

ESISTONO ALTRI DERIVATI “**NON** ESTRATTIVI”, TIPO LE
POLVERI TITOLATE

ALCUNE POLVERI ISCRITTE ALLA F.U.

....polvere titolata =

...pulvis normatus

- **BELLADONNA POLVERE TITOLATA**
Belladonnae pulvis normatus
- **GIUSQUIAMO POLVERE TITOLATA**
Hyoscyami pulvis normatus
- **IPECACUANA POLVERE TITOLATA**
Ipecacuanhae pulvis normatus
- **STRAMONIO POLVERE TITOLATA**
Stramonii pulvis normatus

CONFRONTO FRA LA POLVERE TITOLATA E L' E.S.S.T. di BELLADONNA (*Atropa belladonna* L.)

BELLADONNA POLVERE TITOLATA

...è costituita da foglie di "Belladonna" polverizzate (180).. Titolo - ...in alcaloidi totali compreso fra 0,28 e 0.32 %, espressi come iosciamina (Mr = 289,4) e calcolati ...sulla droga essiccata a 100-105° C. Se necessario, questo titolo può essere ottenuto per aggiunta di lattosio in polvere o di polvere di belladonna a titolo inferiore...

BELLADONNA ESTRATTO SECCO

Titolo - non meno di 0,95% e non più di 1,05 % di alcaloidi totali espressi come iosciamina e calcolati sulla sostanza essiccata.

Preparazione - Belladonna foglie polverizzate (1000)...p. 1000

Alcool al 70 per cento.....q.b

.....

ESTRAZIONE (in sintesi)

Fasi

a) si esaurisce la **droga vegetale** (previamente lavorata) ponendola a contatto (**macerazione, percolazione, Soxhlet...**) con solvente/i

b) **concentrazione** della soluzione filtrata, con evaporazione del solvente, fino ad una certa consistenza:

Secondo la F.U.: **Es.Fluidi**, **Es.Molli**, **Es.Secchi**

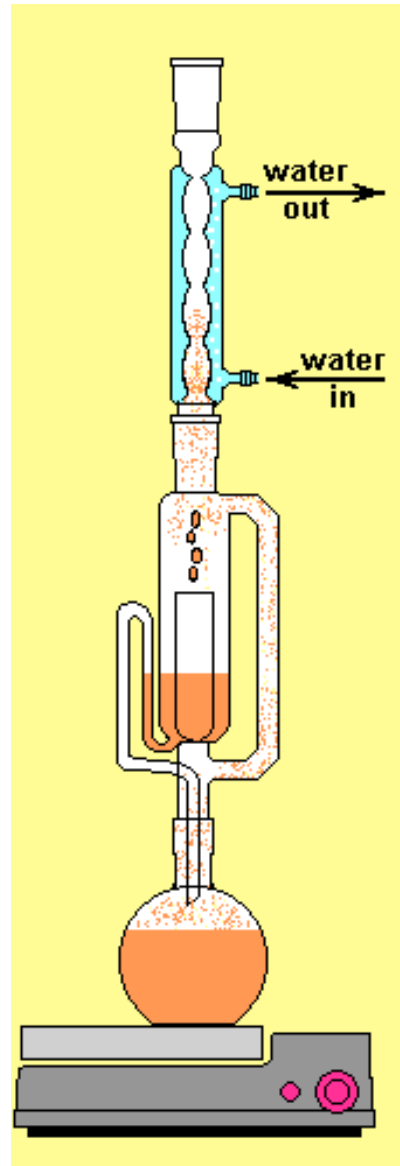
c) **ES**, **standardizzazione e titolazione**

→→→ **ESST**

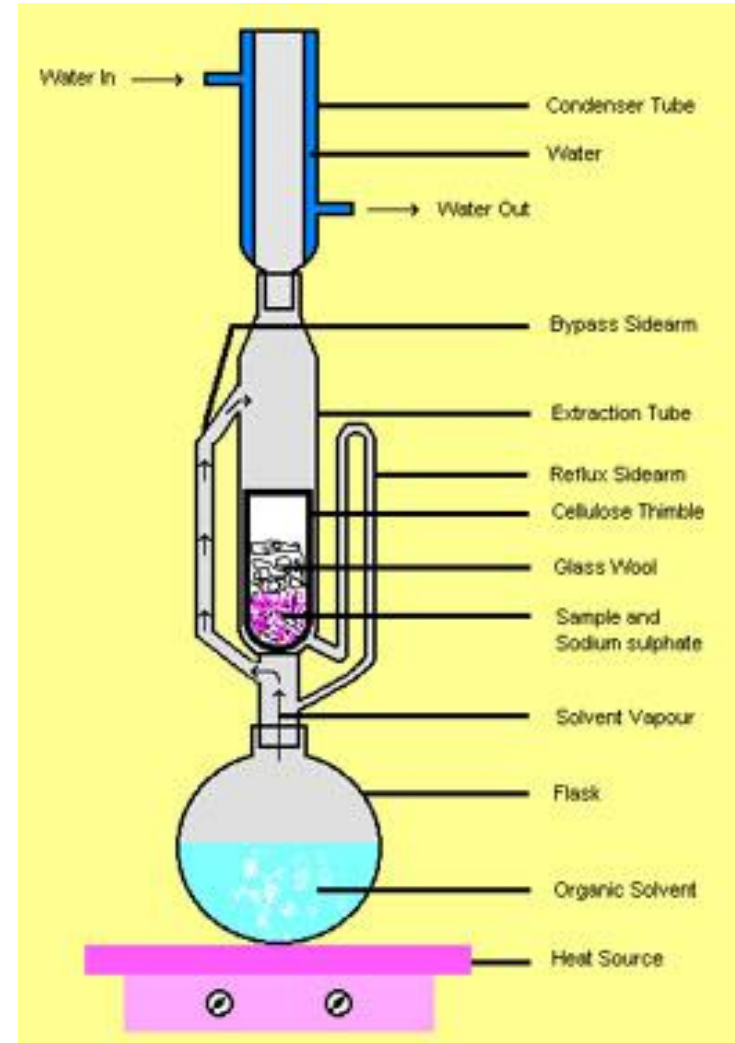
FASI DELLA ESTRAZIONE (a)

- a-1) Preparazione della droga: essiccamento (?!),
contusione, frammentazione,
triturazione, polverizzazione**
- a-2) umidificazione, macerazione in solvente/i
idoneo/i, a una certa T e per un certo tempo**
- a-3) percolazione: passaggio con solvente/i
nel percolatore**

Percolatore



Estrattore Soxhlet



FASI DELLA ESTRAZIONE (b)

b-1) Concentrazione: si fa evaporare il solvente, in opportune condizioni di T e P, fino a un certo grado di consistenza....→

b-2) Estratti fluidi (EF) - F.U. “..Preparazioni liquide nelle quali, in generale, 1 parte in peso corrisponde ad 1 parte in peso di materia prima essiccata (droga)...”

Quindi il rapporto droga estratto (D/E) = 1/1

FASI DELLA ESTRAZIONE (c)

b-3) Estratti molli (EM): “..Preparazioni di consistenza intermedia fra Estratti fluidi e Estratti secchi (ES)..”

b-4) Estratti secchi (ES): “..Preparazioni polverulente, più o meno agglomerate, ottenute per evaporazione totale dei liquidi estrattivi..”

FASI DELLA ESTRAZIONE (d)

b/c) **Estratti secchi (ES)** → ESST

Definizione (FU) “..Sono preparazioni solide, ottenute per evaporazione del solvente usato per la loro preparazione. Hanno in generale un residuo secco non < al 95 % in massa. Il contenuto dei costituenti degli ES titolati può essere aggiustato al valore prescritto per mezzo di sostanze inerti appropriate o per mezzo di un altro ES ottenuto da materia prima vegetale utilizzata per la loro preparazione (= ESST).

Se del caso, la monografia prescrive un saggio limite per il solvente impiegato nella estrazione..”

IN PRATICA.....
COME SI OTTENGONO GLI E.S.S.T.
fase (1°)

- **il materiale vegetale**
messo a contatto con un solvente
per un certo tempo (**macerazione**)
- si filtra e il filtrato si **concentra** in modo
da far evaporare completamente il solvente,
cioè fino a secchezza (= E.S.)

fase (II°)

- Standardizzazione: tutto l'E.S. prodotto deve avere , \approx stesso/i contenuto/i di p.a. dichiarati (= le stesse proprietà)
- Titolazione dell'E.S.S. (= dosaggio quantitativo):
è il controllo analitico dei p.a.
Es gli antociani, nel caso mirtillo nero:
 $\approx 25\%$ (23 \rightarrow 26%)
- N.B.** La titolazione si attua direttamente sull'E.S.S., e non sul materiale vegetale di partenza, che pure deve essere **controllato** \Downarrow

EUROPEAN PHARMACOPOEIA

1) BILBERRY FRUIT, FRESH

Myrtilli fructus recens

DEFINITION – Fresh or frozen ripe fruit of *Vaccinium myrtillus* L.

Content: minimum 0,30 % of anthocyanins, expressed as cyanidin-3-glucoside chloride

STORAGE – When frozen, store at or below – 18° C

2) BILBERRY FRUIT, DRIED

Myrtilli fructus siccus

DEFINITION – Dried ripe fruit of *Vaccinium myrtillus* L.

Content: minimum 1,0% of tannins, expressed as pyrogallol

Iscritto alla F.U. Italiana:

**MIRTILLO NERO ESTRATTO IDROALCOOLICO
SECCO AD ALTO TITOLO**

*Vaccinii fructus extractum
hydroalcoholicum siccum concentratum*

DEFINIZIONE

L'estratto idroalcolico secco ad alto titolo di mirtillo si ottiene dai frutti freschi del mirtillo (*Vaccinium myrtillus* L.).
Contiene non meno del 23,8 per cento e non più del 26,2 per cento di antocianosidi, calcolati come antocianidine.

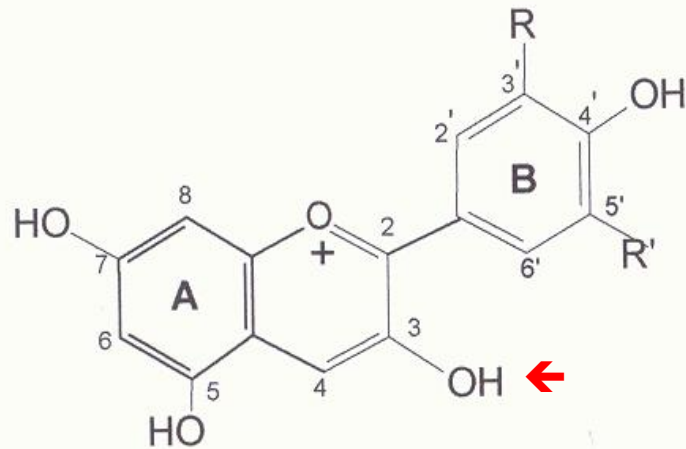
.....

PREPARAZIONE

...si prepara dai frutti freschi per trattamento con metanolo, impiegando un metodo appropriato ecc ecc.

ANTOCIANI

Antocianidine (agliconi)



	R	R'
cianidina	OH	H
peonidina	H	OCH ₃
delfinidina	OH	OH
petunidina	OH	OCH ₃
malvidina	OCH ₃	OCH ₃

In natura sono legati in posizione 3 a uno, o più zuccheri (glicidi): sono gli antocianosidi

In fase di estrazione, parte dello zucchero si stacca e rimane l'aglicone, attivo

QUALITA' DEGLI E.S.S.T.

TUTTA LA PRODUZIONE

CHE ENTRA IN COMMERCIO DEVE POSSEDERE

LE STESSA CARATTERISTICHE DI:

CONTENUTI, GRADO DI PUREZZA, PROPRIETA'

L'ACCERTAMENTO DELLA QUALITA' FITERAPICA

COMPORTE VERIFICHE
IN SEQUENZA...

HACCP

Hazard Analysis and Critical Control Points (analisi dei pericoli e controllo dei punti critici)

Il sistema HACCP tende a garantire preventivamente la sicurezza dei prodotti (alimenti, farmaci ecc.) e delle preparazioni (galeniche, erboristiche...), con identificazione e gestione dei rischi, a livello di procedimenti sicuri in tutte le fasi di produzione

Piano di campionamento

**PIANO DI CAMPIONAMENTO: DEVE ACCERTARE
LA QUALITA' DEL PRODOTTO FINITO**

- (a) “che cosa” controllare e con quali “limiti”
- (b) su quanti campioni (**n**) di un lotto (**N**),
va fatto il controllo (spesso “distruttivo”)?
 - (c) con quale/i metodo/i ?
 - (d) a quali costi ?!
- (e) come valutare la significatività dei dati
ottenuti su **n** , rispetto all'intero lotto **N** ??

**Con il piano di campionamento si impostano
correttamente questi fattori**

Fra i parametri che caratterizzano la qualità fitoterapica di un ESST al primo posto:

CONTENUTO IN PRINCIPI ATTIVI

- Composti attivi (o ritenuti tali): sono i più importanti!
- talora si titolano i markers: sono composti → (a) peculiari della droga e → (b) più adatti per l'analisi

Esempi: echinacee, iperico...

Sono controllabili anche **altre** caratteristiche: fisiche, merceologiche etc.

Es .uniformità di peso (comprese, capsule)

echinacea (o echinacee?) ***Echinacea* spp !**

Echinacea angustifolia DC



Echinacea pallida (Nutt.) Nutt.

Echinacea purpurea (L.) Moench



Nel caso di *Echinacea* spp quali p.a. sono da valutare ?

Si dovrebbero tener presenti le proprietà che si intendono sfruttare per un utilizzo fitoterapico o salutistico,

...in funzione dei principi attivi (ritenuti) responsabili,

...presenti, prevalentemente, in una delle specie di *Echinacea*,

...e, in particolare, o nelle radici (?), e/o nelle parti aeree (?)

Si presuppone che l'estrazione sia stata fatta con una metodologia idonea (solvente/i? modalità? etc)...

...e la formulazione del preparato sia compatibile con la natura dei componenti attivi (tintura? estratto secco?...) !!

I PRINCIPALI COMPONENTI DI *ECHINACEA spp.*

Frazione apolare:

(oli essenziali), N-isobutilammidi, polieni

Frazione di media polarità:

derivati dell'acido caffeico, glicosidi fenilpropanoidi (echinacoside),
glicoproteine

Frazione polare:

polisaccaridi ad alto peso molecolare

Profilo fitochimico comparativo e presenza dei p.a. (→ +++))
nelle tre specie di *Echinacea*
(r = radici; f = foglie, parti aeree)

<u>Componenti</u>	<i>E.angustifolia</i>	<i>E.pallida</i>	<i>E.purpurea</i>
- Alcammidi	++++ r	-	+++ r f
- Polieni	-	++++ r	-
- Acido cicorico	-	-	+++ r f
- Echinacoside	+++ r	+++ r	-
- Cinarina	+++ r	-	-
- Polisaccaridi e glicoproteine	+++ r f	+++ r f	+++ r f

Attività (prevalenti ?!) dei diversi costituenti di *Echinacea*

(riscontrate sperimentalmente)

Alcammidi: immunostimolanti

Polieni: ??

Acido cicorico: antiossidanti, antibatteriche, antivirali, immunostimolanti

Echinacoside: antiossidanti, antibatteriche, antivirali

Cinarina: epatoprotettive, antiossidanti, ipocolesterolemizzanti, anti-HIV

Polisaccaridi e glicoproteine: immunostimolanti

Su quali classi di componenti, fare il controllo qualità ????

DEFINIZIONI E TERMINI IN USO NEI PIANI DI CAMPIONAMENTO (a)

- Lotto da controllare (**N**): quantità di campioni, come numero, o prodotti in un dato tempo (es un giorno)

N.B. In etichetta il lotto viene indicato con numero e scadenza

- campioni da esaminare (**n**): quelle unità che realmente verranno prelevate e analizzate

Dopo l'analisi si definiscono unità

.. conformi: hanno caratteristiche entro i limiti dei protocolli (Farmacopee)

-... difettose: quelle che **non** rientrano

DEFINIZIONI E TERMINI.... (b)

A) CARATTERISTICHE MISURABILI (= VARIABILI)

Sono grandezze **quantificabili** e possono essere ...

1) ..con intervallo di tolleranza **unilaterale** (inferiore o superiore)

Esempi: contenuto in p.a., elementi estranei,
indice di perossidi, indice di rigonfiamento,...

2) ..con intervallo di tolleranza **bilaterale**: uniformità di
peso , densità, residuo all'evaporazione.....

B) CARATTERISTICHE NON MISURABILI (= ATTRIBUTI)

Non quantificabili, ma valutabili in modo qualitativo,
con “scale di valori”: aspetto, colore, sapore,
solubilità in certi solventi, limpidezza....

TECNICHE ANALITICHE

- Cromatografia su **strato sottile (TLC)**
- Cromatografia su **s.s.** ad alta efficienza (**HPTLC**)
- Cromatografia liquida ad alta efficienza (**HPLC**):
<**HPLC**: NPC, RPC, IEC>
- Gas Cromatografia (**GLC**; GSC)

TECNICHE ACCOPPIATE

Cromatografia/Spettrometria di Massa:

<**HPLC MS**; **GLC MS**>

**Cromatografia Liquida Alta Efficienza, a fase inversa,
con rivelatore Diode Array Detector**

(Reverse-Phase HPLC, DAD-detection)

Validazione dei metodi analitici

La validazione del metodo è il processo che dimostra che un metodo analitico è adatto allo scopo per il quale è stato sviluppato.

Le linee guida per la validazione sono definite da Enti Internazionali (*).

In analisi dei farmaci, i parametri di validazione del metodo per l'ottemperanza ai regolamenti comprendono:

SPECIFICITA'

LINEARITA'

ACCURATEZZA

PRECISIONE

RANGE

LIMITE DI DETERMINAZIONE (LOD)

LIMITE DI QUANTIFICAZIONE (LOQ)

ROBUSTEZZA

(*) INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Linea guida di riferimento: VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1) (Novembre 2005).

CARATTERISTICHE DEI METODI DI ANALISI CHIMICHE

- ACCURATEZZA (CORRETTEZZA) (**accuracy**)
Parametro : recovery % (100% sarebbe ideale)
- LINEARITA' : r^2 (tende a 1 in caso di un buon metodo)
- RIPRODUCIBILITA' (PRECISIONE) (**precision**)
Parametro : SD (σ) %
- SENSIBILITA' :
 - a) limite rilevabile (detection limit, LOD)
 - b) limite quantificabile (quantification limit, LOQ)
N.B. $b \cong 5 \times a // 10 \times a$
- SELETTIVITA' (\rightarrow SPECIFICITA' !)
- -----
- LIMITI FIDUCIALI (~ 2 ES) (**limits of confidence**)
- AFFIDABILITA' (ATTENDIBILITA') (**reliability**)
 - "ROBUSTEZZA" (?)
- SIGNIFICATIVITA' (TEST DI STUDENT, p, etc.)

LE FARMACOPEE

Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana (FU):
Farmacopea Europea e Farmacopea Ufficiale

- 8th Edizione della **Farmacopea Europea** dal 1° Gennaio 2014 e Supplemento 8.1 (1 aprile 2014), Supplemento 8.2 (1 luglio 2014), Supplemento 8.3 (1 gennaio 2015), Supplemento 8.4 (1 aprile 2015)
- XII Edizione della **Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana**
- **Aggiornamento** e correzione della XII Edizione della Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana

**Nelle Farmacopee sono riportate le
“Monografie” di piante medicinali.
Possono riguardare sia la droga vegetale,
sia l’E.S., sia altri derivati**

Esempio (F.Eur.):

Ginkgo biloba L.:

-Ginkgo leaf

-Ginkgo dry extract, refined and quantified

(Ginkgonis extractum siccum raffinatum et quantificatum)

GINKGO LEAF

Ginkgonis folium

DEFINITION

Whole or fragmented, dried leaf of *Ginkgo biloba* L.

***Content:* not less than 0.5 per cent of flavonoids, expressed as flavone glycosides (dried drug)**

IDENTIFICATION

- A.** The leaf is greyish or yellowish-green or yellowish-brown. The upper surface is slightly darker than the lower surface. The petioles are about 4-9 cm long. The lamina is about 4-10 cm wide, fan-shaped, usually bilobate or sometimes undivided. Both surfaces are smooth, and the venation dichotomous, the veins appearing to radiate from the base; they are equally prominent on both surfaces. The distal margin is incised, irregularly and to different degrees, and irregularly lobate or emarginate. The lateral margins are entire and taper towards the base.
- B.** Reduce to a powder (355) (2.9.12). The powder is greyish or yellowish-green or yellowish-brown. Examine under a microscope using chloral hydrate solution R. The powder shows the following diagnostic characters (Figure 1828.-1): irregularly-shaped fragments of the lamina[A, B, D, E], with the upper epidermis, in surface view [D] and transverse
- C.** ETC ETC

GINKGO DRY EXTRACT, REFINED AND QUANTIFIED

Ginkgonis extractum siccum raffinatum et quantificatum

DEFINITION: Refined and quantified dry extract produced from *Ginkgo* leaf.

Content :

- flavonoids, expressed as flavone glycosides (M_r 756.7): 22.0 per cent to 27.0 per cent (dried extract);
- bilobalide: 2.6 per cent to 3.2 per cent (dried extract);
- ginkgolides A, B and C: 2.8 per cent to 3.4 per cent (dried extract) ;
- ginkgolic acids: maximum 5 ppm (dried extract).

.....**omissis**...

PRODUCTION

The extract is produced from the herbal drug by an appropriate procedure using organic solvents and their mixtures with water, physical separation steps as well as other suitable processes.

.....**omissis**...

- **CHARACTERS...**
- **IDENTIFICATION...**
- **DETECTION...**
- **Etc etc...**

ALTRI PROTOCOLLI DI RIFERIMENTO



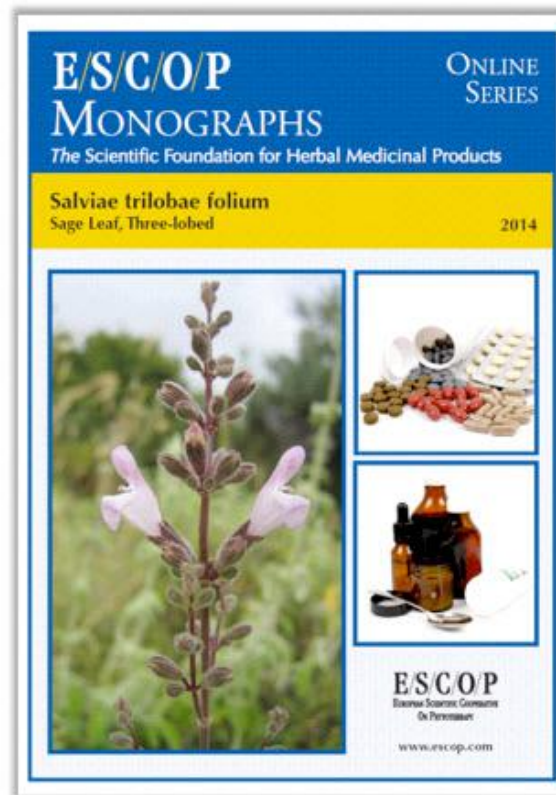
OMS: Monografie di Piante Medicinali

Volumi 1, 2, 3, 4

Edizioni a cura della SIFIT (Società Italiana di Fitoterapia)

E.S.C.O.P

European Scientific Cooperative on Phytotherapy



CONSIDERAZIONI SULLA QUALITA' FITOTERAPICA

Problemi a monte:

- proprietà sperimentalmente accertate ed..
 - ...eventuali utilizzazioni consolidate....
- conoscenza dei componenti responsabili...
 - tipo di preparato e corretta posologia
- “presentazione” (etichetta? scheda tecnica?)

- Campionamento: preparazione del campione da analizzare
- Scelta, messa a punto e applicazione di un metodo affidabile
- Valutazione dei risultati, in base ai protocolli

Servono normative aggiornate e uniformi per il settore
dei farmaci e integratori di origine vegetale

Bibliografia essenziale

- **A.Bruni, M.Nicoletti, “Dizionario ragionato di Erboristeria e di Fitoterapia”, Piccin Ed., Padova, 2003**
- **E.Campanini, “Dizionario di fitoterapia e piante medicinali”, Tec.Nuove, Milano, 2004**
- **O.Cucconi & al, “Manuale dei piani di campionamento”, S.E.F.Ed., Milano, 1980**
- **Farmacopea Uff. (FU) “Droghe vegetali e preparazioni”, 1991; Ediz. in corso legale –**
- **Farm.Europea, Ediz. in corso legale**
- **F.Firenzuoli, "Fitoterapia", 3° Ed., Ed.Masson, Milano, 2002**
- **I.Morelli, G.Flamini, L.Pistelli, “Manuale dell’erborista”, Tec. Nuove, Milano, 2005**
- **O.M.S.,”Monografie di piante medicinali”, Ed. SIFIT, Siena, 2002, 2004 e sgg.**
- **S.Vianello, “Controllo di qualità e statistica nell’industria farmaceutica”, Tec.Nuove, Milano, 2004**

Sitografia

- **www.escop.com/ , Monographs, OnLineSeries**
- **<http://www.sisteweb.it/>**
- **<http://www.sifit.org/>**
- **<http://users.unimi.it/phytosif/>**
- **<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/>**