

Corso “Prodotti naturali e fitoterapici” - (IV°)
Università di Parma

**“Quale” qualità fitoterapica controllare:
campionamento, parametri,
metodologie, valutazioni**

27 aprile 2006

Prof. Michele Melegari
(Facoltà di Farmacia - Università di Modena e Reggio Emilia)

PROBLEMI DI TIPO GENERALE

Come va impostato un controllo di qualità:

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

I piani di campionamento servono a risolvere tali problemi !

Fra i parametri discussi nella III° parte

1- Identità botanica...

2- Componenti attivi...

3- Conformità dei p.a.
alle finalità prefisse

per decidere “che cosa” controllare nelle droghe
e/o nei derivati fitoterapici...

**...sono importanti soprattutto i contenuti in composti attivi, o
ritenuti tali; ma anche altre caratteristiche sono
meritevoli di attenzione (cf. oltre)**

Definiti gli obiettivi in base alle caratteristiche che si intende “controllare”, si impostano

**...LE FASI DEL CAMPIONAMENTO
<lo schema qui illustrato può essere riferito al controllo di capsule, compresse, perle etc>**

- 1) “Costruzione” di un piano di campionamento**
- 2) Prelievo di n campioni (a random) dal lotto N**
- 3) Scelta e applicazione della idonea metodica analitica**
- 4) Interpretazione dei dati e valutazione finale in base a quanto previsto dal “piano”**

DEFINIZIONI E TERMINI DI USO CORRENTE (I)

- Lotto da controllare (= N): indica la quantità di campioni, in numero e/o prodotti in un dato tempo (es. un giorno);
in etichetta il lotto viene indicato con
numero e scadenza
- campioni da controllare (= n): sono quelli che
realmente verranno prelevati e analizzati !
- unità conformi: in possesso di caratteristiche entro i
limiti dei protocolli (es. F.U.)
- unità difettose: quelle...che non rientrano !

DEFINIZIONI E TERMINI DI USO CORRENTE (II)

A) CARATTERISTICHE MISURABILI (= VARIABILI)

Sono grandezze quantificabili e si distinguono in:

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

Esempi: titolo in p.a. (*?), perdita all'essiccamento, ceneri, elementi estranei, indice di perossidi, indice di rigonfiamento,...

2) v. con intervallo di tolleranza bilaterale; esempi: uniformità di peso del preparato, densità, indice di rifrazione, angolo di rotazione ottica, residuo all'evaporazione.....

B) CARATTERISTICHE NON MISURABILI (= ATTRIBUTI)

**Non quantificabili, ma pure valutabili in modo qualitativo. Es.:
aspetto, colore, sapore, solubilità in certi solventi, limpidezza....**

1) Il piano di campionamento (I)

1a) A seconda delle caratteristiche, si imposta un....

- campionamento per variabili (es. uniformità di peso); in tal caso, con intervallo di tolleranza unilaterale o bilaterale (!?)
- campionamento per attributi (es. aspetto, colore...)

1b) Stabilire a priori il “livello di qualità” (p): indica le unità difettose di un lotto (N) ! Maggiore sarà p = più bassa la qualità!

p_0 = qualità accettabile p_1 = qualità tollerabile
ovviamente $p_0 < p_1$!

1c) Alla fine della procedura analitica si otterrà p di n :

- se $p \leq p_0$ = qualità del lotto N buona
- se $p \geq p_1$ = qualità del lotto N scadente
- se $p_0 < p < p_1$ = qualità del lotto N accettabile

1) Il piano di campionamento (II)

1d) Stabilire (e concordare..) a priori i “rischi del...”:

- “... venditore” (α), che un lotto buono venga rifiutato!
 - “... compratore” (β), che un lotto scadente venga accettato!
- α e β vengono indicati come probabilità % (10%? 5%?)

N.B. Considerazioni preliminari di cui tenere conto:

dato che il piano indicherà il n di analisi da fare (= tempo, costi..!), se in partenza s'intende ridurre i “rischi”, n risulterà più grande!

Questa consapevolezza è fondamentale per impostare il piano

1e) Altro parametro che uscirà dal piano è la f = frazione critica % delle unità difettose, che al termine della procedura andrà confrontata con f = frazione critica sperimentale

1) Il piano di campionamento (III)

In sunto quindi.....

...il piano, in base ai fattori prefissati e concordati (p_0 , p_1 , α , β), indicherà su quanti campioni (n) va fatto il controllo e che valore di f critica non deve essere superato dalla f sperimentale, perché il lotto N sia accettato.

Per l'applicazione del piano →

- prelievo di n campioni dal lotto N
- criteri di prelievo: nel tempo, come, dove etc...
- applicazione della metodica analitica più idonea alla determinazione di p ... →
... → per accuratezza, riproducibilità, sensibilità (LOD, LOQ)
- elaborazione dei dati sperimentali: μ , SD,....
- calcolo della f% sperimentale di n e giudizio su N

UN ESEMPIO PRATICO (I)

- + Piano per variabili, con limiti di tolleranza bilaterali: controllo di uniformità di peso di comprese (con esclusione di errori sistematici !)
- + Si stabiliscono $p_0 : 0,015$; $p_1 : 0,10$; $\alpha = \beta : 5 \%$
- + In base a tali parametri si ricava, dal Metodo di campionamento applicato, il valore di $f = 4,4 \%$:
è la frazione critica di unità difettose, con cui andrà confrontata la f sperimentale
 - + Si ricava inoltre $\underline{n} = 37$
- + Si prelevano quindi 37 compresse dal lotto N (di 50.000) con criteri di casualità, distribuzione nel tempo e nello spazio etc

UN ESEMPIO PRATICO (II)

- + peso dichiarato : 300 mg
- + secondo FU, l'intervallo di tolleranza bilaterale è $\pm 5\%$,
cioè L 285 mg e U 315 mg
- + p_0 : 0,015 qualità accettabile, se solo 1,5% è fuori peso
- + p_1 : 0,10 qualità tollerabile, se solo il 10% è fuori peso
- + uguali i “rischi”, fissati al 5%

+ Si procede alle pesate:

+ μ 303 mg , $\sigma \pm 5,8$ ($\pm 1,9\%$)

+ Si applica il metodo di campionamento con:

$$U - \mu / \sigma \quad \mu - L / \sigma$$

+ Si ricava il valore critico sperimentale di f %,

che risulta **0,020** (2,0%)

+ essendo **0,020 < 0,044**

il lotto N viene accettato !!

COMMENTI SU QUESTO ESEMPIO

- Nella esecuzione delle prove analitiche (si tratta di pesate) si presume che siano assenti errori sistematici !
- Nella preparazione del derivato (compresse) sono stati commessi, a monte , errori sistematici relativi alla uniformità di peso?? Parrebbe di no (?), dai dati..
- Anche la riproducibilità dei valori ($= \sigma \%$) è apprezzabile
- Nel caso, invece, di una serie la cui $\sigma \%$ fosse più elevata (= dati più dispersi), essa influenzerebbe negativamente il valore sperimentale di $f\%$, dato che :

$$U - \mu / \sigma \quad \mu - L / \sigma$$

<vedasi l'applicazione del Metodo di campionamento>

CONTENUTI IN P.A. : QUALI CONSIDERARE ? ...E PERCHE' ?

Per esempio, nel caso di *Echinacea* spp ?

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 certa specie di *Echinacea*,

....e in particolare nelle radici e/o nelle parti aeree.

Ciò comporta l'estrazione con una metodologia idonea (solvente/i? modalità? etc),

...e la formulazione di derivati conformi alla natura dei componenti attivi (tintura? estratto secco?...) !!

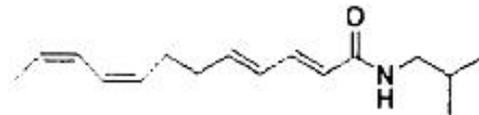
I PRINCIPALI COMPONENTI DI *ECHINACEA spp.*

**Frazione apolare: (oli essenziali),
N-isobutilammidi, polieni**

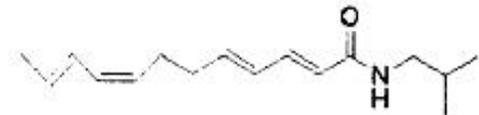
**Frazione di media polarità:
derivati dell'acido caffeico,
glicosidi fenilpropanoidi (echinacoside),
glicoproteine**

**Frazione polare:
polisaccaridi ad alto peso molecolare**

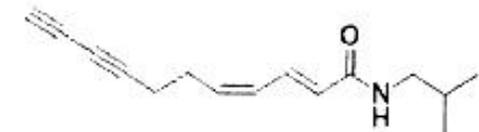
Figura 1. Alcammidi e chetoalcheni(ini) dell'echinacea.



2E, 4E, 8Z, 10Z-N-Isobutil-2,4,8,10-dodecatetraenammiide



2E, 4E, 8Z, 10E-N-Isobutil-2,4,8,10-dodecatetraenammiide



2E, 4Z-N-Isobutil-undeca-2,4-dien-8,10-diinamide



2E, 9Z-N-Isobutil-pentadeca-2,9-dien-12,14-diinamide



Echinolone (*E. angustifolia*)

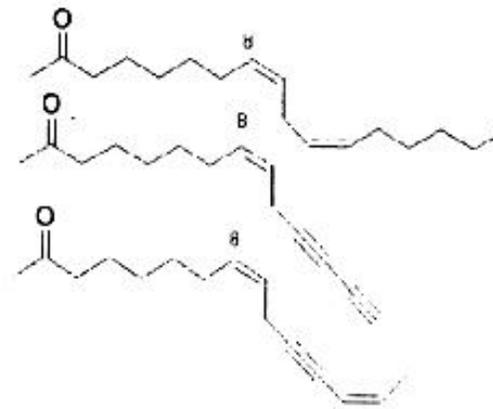
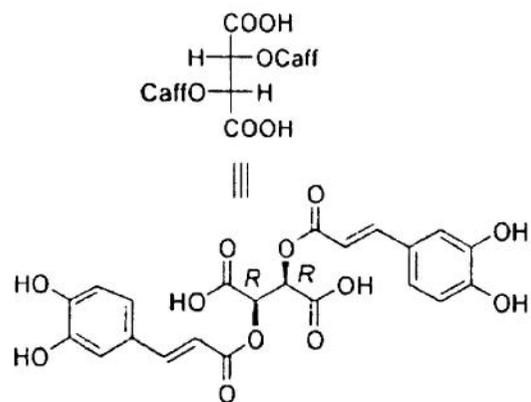
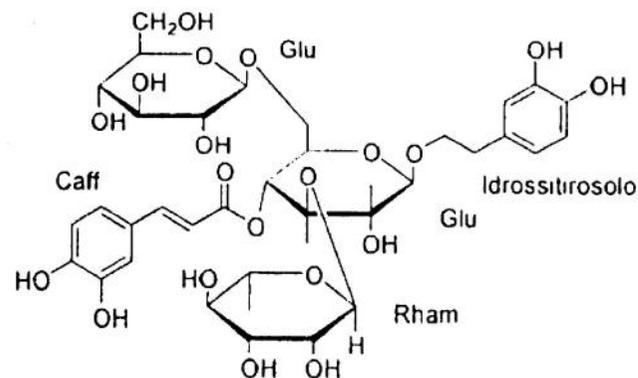


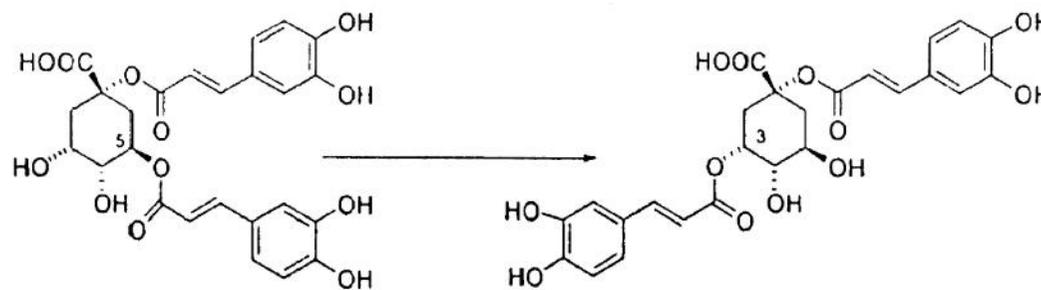
Figura 2. Coniugati caffeici dell'echinacea.



Acico L-Cicorico



Echinacoside



Acido 1,5 (*trans*)-dicaffeoilchinico

Acido 1,3 (*cis*)-dicaffeoilchinico (Cinarina)

Profilo fitochimico comparativo delle tre specie di *Echinacea* (**r** = radici; **f** = foglie, parti aeree)

<u>Componenti</u>	<u><i>E.angustifolia</i></u>	<u><i>E.pallida</i></u>	<u><i>E.purpurea</i></u>
- 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
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**

**Alcuni preparati del commercio
a base di *Echinacea*
Che cosa controllare....?**

(A)

“....” capsule

Integratore alimentare di *Echinacea Purpurea EchinaceaAngustifolia*.

Le capsule ad Alta Potenza “.....” sono una combinazione di polveri di radici/foglie unite agli estratti standardizzati della pianta intera. Questa eccellente combinazione concentra le massime proprietà benefiche dell'*Echinacea* fresca in una capsula bilanciata ad alta efficacia.

INGREDIENTI ATTIVI PER PERLA :

<i>Echinacea (pianta intera)</i>	270 mg
<i>Echinacea (parte aerea)</i>	75 mg
<i>Echinacea Angustifolia</i>	5 mg

(B)

Descrizione - nome botanico -

metodo di analisi - solvente di estrazione

ECHINACEA PURP. estratto secco ≥ 4.0 Polifenoli tot.- *Echinacea purpurea*
- H.P.L.C. - idroalc.70°

ECHINACEA ANG. estratto secco ≥ 4.0 Echinacoside- *Echinacea angustifolia*
- H.P.L.C - idroalc.70°

ECHINACEA ANG. estratto secco ≥ 0.6 Echinacoside- *Echinacea angustifolia*
- H.P.L.C. - idroalc.70°

“Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp”

F.Pellati, S.Benvenuti, L.Magro, M.Melegari, F.Soragni
J. Pharm.Biomed.Anal., 35, 289-301; 2004

Risultati

Contenuto totale (p/p) di composti fenolici (1) in radici di *Echinacea* spp. e attività antiossidante (2)

(1) via RP HPLC, espresso in mg/g, e calcolato sommando l'ac.caffeico + ac.caftarico + ac.cicorico + ac.clorogenico + cinarina + echinacoside

(2) espressa come EC₅₀: valore (in µg/mL) richiesto per ridurre del 50% l'iniziale concentrazione del radicale DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl)

specie	polifenoli (mg/g)	attività antiradicalica (EC₅₀)
<i>E.angustifolia</i>	10,49	231 ±2,8
<i>E.pallida</i>	17,83	167 ±1,6
<i>E.purpurea</i>	23,23	134 ±0,7

Citrus aurantium L subs. *amara* Engler
(arancia amara)

Nella Farmacopea Italiana sono iscritti:

- Arancia amara corteccia

- Arancia amara essenza

.....ma il derivato maggiormente utilizzato oggi è :

Estratto secco

Citrus aurantium L subs. *amara* Engler



...”per gli estratti contenenti
sinefrina...

il dosaggio massimo
giornaliero

consentito è 50 mg. Cautela
nell’uso in soggetti a rischio

cardiovascolare.... oltre

ai bambini e donne

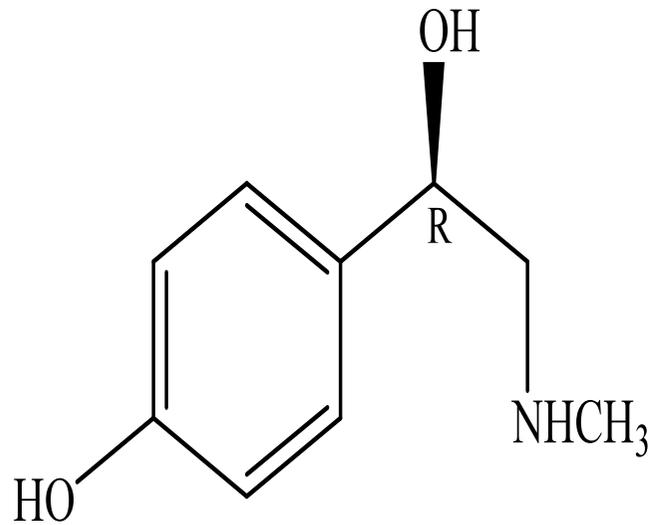
in stato di gravidanza...”

Contenuto di sinefrina in *C.aurantium* :
frutti interi e parti – estratti secchi - integratori vari
(mg/g, s.s.)

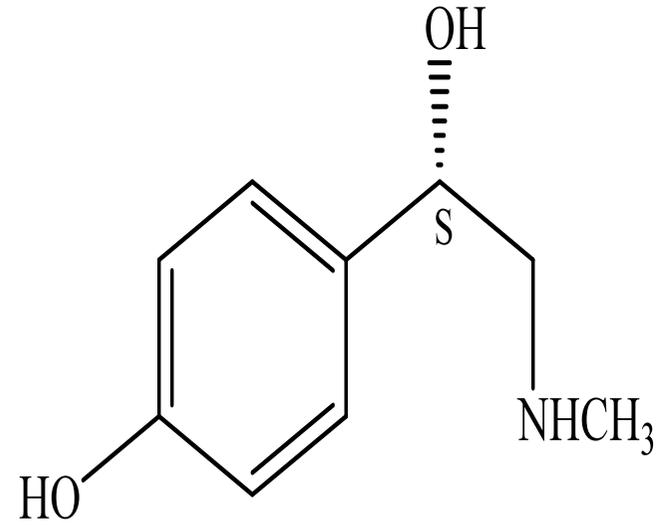
Campione	(-)- sinefrina	(+)- sinefrina	totale
Frutto intero	0,99	<LOD	0,99
Corteccia	1,14	<LOD	1,14
Polpa	0,33	<LOD	0,33
Semi	0,06	<LOD	0,06
E.S. n.1	34,98	6,14	41,12
E.S. n.2	25,55	1,43	26,98
Integr.alim.n.1	20,88	1,52	22,39
Integr.alim.n.2	20,18	1,04	21,23
Integr.alim.n.3	5,58	0,32	5,90
Integr.alim.n.4	0,39	0,10	0,49
Integr.alim.n.5	5,67	0,53	6,19

SINEFRINA:

...ulteriore complicazione, in quanto tale composto può esistere in due forme:



(-)-Synephrine (1a)



(+)-Synephrine (1b)

Metodologia impiegata:

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

(Reverse-Phase HPLC, DAD-detection)

**Scelta del sistema solvente più appropriato per
l'estrazione e preparazione del campione :
metanolo acquoso 80 %**

Validazione del metodo:

- **parametri cromatografici (risoluzione, selettività, etc.)**
 - **linearità (r^2)**
 - **accuratezza (recovery %)**
 - **riproducibilità (= precisione) (S.D.)**
 - **limiti di rilevazione (LOD)**
 - **limiti di quantificazione (LOQ)**

-

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 (quantitation limit, LOQ)
N.B. $b \approx 5 \times a // 10 \times a$
- SELETTIVITA' (\rightarrow SPECIFICITA' !)
- -----
- LIMITI FIDUCIALI (~ 2 ES) (**limits of confidence**)
- AFFIDABILITA' (ATTENDIBILITA') (**reliability**)
 - "ROBUSTEZZA" (?)
- SIGNIFICATIVITA' (TEST DI STUDENT, p, etc.)

Talora sorgono problemi di denominazioni botaniche..

Il recente caso dell'anice stellato

Illicium verum Hooker

(sin. *I. anisatum* Lourier)

anice stellato cinese, badiana

Illicium anisatum L.

(sin. *I. religiosum* Sieb, *I. japonticum*)

anice stellato giapponese, anice “bastardo”, shikimi

...delle caratteristiche farmacognostiche →

I.verum →



I.anisatum →



“Quale” qualità...PR 2006
M.Melegari

....e quindi i problemi di : proprietà - utilizzi -
aspetti fitochimici e bio-tossicologici

Illicium verum Hooker : ha proprietà carminative, stomachiche,
espettoranti; molto usato anche in liquoristica

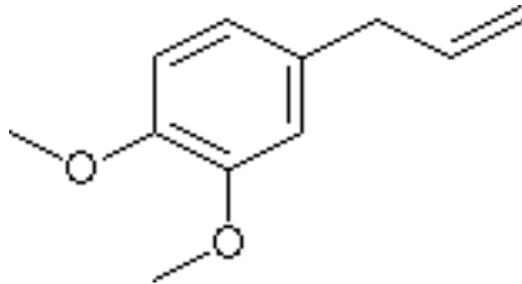
Contiene 5-9 % di o.e., costituito per 83-96 % di trans-anetolo;
praticamente assenti composti potenzialmente tossici.

E' l'unico "anice stellato" certamente privo di
tossicità!

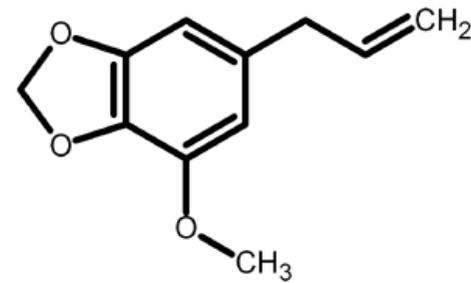
Illicium anisatum L. - Tossico a carico del SNC!!
Effetti convulsivanti , attribuibili a diversi composti:
metil eugenolo, miristicina, safrolo, ..altri

Per individuare le possibili contaminazioni, e la presenza di tali
composti, occorre una tecnica analitica adeguata: **GC/MS**

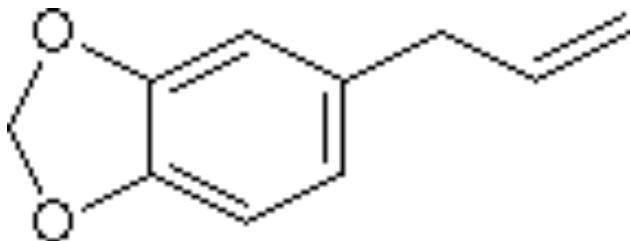
Metileugenolo



Miristicina



Safrolo



CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE SUL CONTROLLO DI “QUALITA” DI PRODOTTI SALUTISTICI E FITOTERAPICI

I problemi sono a monte.... e in particolare vertono su :

- proprietà sperimentalmente accertate ed..
 - eventuali utilizzazioni consolidate,....
 - quali classi di componenti ne siano responsabili...
 - tipo di preparato o derivato
 - e sua “presentazione” (etichetta? Scheda tecnica?)
-
- **Campionamento - preparazione del campione da analizzare**
 - **Scelta, messa a punto e applicazione di un metodo affidabile**
 - **Valutazione dei risultati, in funzione dei protocolli (?)**

Alcuni problemi potranno essere risolti con...
...l’entrata in vigore di normative aggiornate (?)
Ma non rientra nell’argomento odierno !

Bibliografia

<da aggiungere alle altre fonti già riportate>

- **O.Cucconi et al., “Manuale dei piani di campionamento”, S.E.F. Ed., Milano, 1980**
- **Farmacopea Europea, V° Ed., 2005**
- **Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana, IX Ed., “Droghe vegetali e preparazioni”
Ist.Poligr.Stato, Roma, 1991; vedasi inoltre F.U. Ediz. in corso legale**
- **I.Morelli, G.Flamini, L.Pistelli, “Manuale dell’erborista”, Tec. Nuove, Milano, 2005**
- **O.M.S., “Monografie di piante medicinali”, Voll.I,II. Ed.SIFIT, Siena, 2002 e 2004**
- **S.Vianello, “Controllo di qualità e statistica nell’industria farmaceutica”, Tec.Nuove,
Milano, 2003**
- **H.Wagner et al., “Plant drug analysis”, Ed.Springer-Verlag, Berlino, 1995**