


Аналитичен контрол при разработване
на фитопродукти: стандартизиране на
активните съставки, аналитични
техники и апаратура.

доц. д-р Петко Денев

Лаборатория по Биологично
Активни Вещества
Институт по Органична Химия с
Център по Фитохимия,
Българска Академия на Науките



БЪЛГАРО-ШВЕЙЦАРСКА
ПРОГРАМА ЗА СЪТРУДНИЧЕСТВО



➤ Разработването на фитопродукти е сложен процес, при който е необходим прецизен аналитичен контрол, във всеки етап от веригата:

-Растителни дрога;

-Растителен препарат:


- растителни екстракти;


- етерични масла;

-Растителен лекарствен продукт;

➤Целта на този аналитичен контрол е да осигури постоянно качество на растителния продукт и дава възможност той да бъде стандартизиран.

➤**Стандартизирането** е процес при разработването на растителни екстракти или лекарствени продукти, при който ефективността на продукта се гарантира чрез поддържане на постоянство в **количеството на активната съставка в продукта.**







➤ Изискванията за стандартизиране, на които трябва да отговарят фитопродуктите (растителни дроги, растителни препарати и растителни лекарствени средства) са описани в издание **8.0 на Европейската фармакопея**.

➤ Освен изискванията за стандартизиране на фитопродукти, във Европейската фармакопея са посочени и различните спецификации, на които трябва да отговарят те.

➤ Под "спецификация" се разбира набор от **аналитични тестове и съответни критерии за допустимост** (числени стойности, граници, лимити и т.н.), чрез които се гарантира, че растителна дрога, препарат или лекарствен продукт могат да бъдат използвани за предварително определеното им предназначение.






➤ “Съответствие със заложените спецификации” означава, че фитопроductът ако бъде тестван, чрез посочните във фармакопеята аналитични методи, ще отговаря на описаните критерии за допустимост.

➤ Спецификацията на даден продукт включва информация за контрол на суровините, производствен контрол, валидиране на съответните методи за анализ, тестове на стабилността, повторяемост на партидите и др. Всички тези елементи взети заедно гарантират, че продукта ще отговаря на предварително зададени критерии, т.е. предварително зададено качество.


➤ Спецификациите на фитопроductите са предназначени преди всичко да гарантират **качество**, а не тяхното пълно охарактеризиране.





Растителни дроги

➤ "Растителни дроги" са основно растения или части от растения, водорасли, гъби, лишеи, които са цели, начупени или нарязани, и се използват в необработено състояние, обикновено в изсушен вид, но понякога и пресни. Някои ексудати, които не са били подложени на специфична обработка, също се отнасят към растителните дроги. Растителните вещества трябва да са с **точно определено ботаническо научно наименование** на растенията, от които произхождат, съгласно биноминалната система (**род, вид, сорт и автор**).



Аналитичен контрол при растителни дроги

➤ Аналитичният контрол при растителните дроги включва:

1. Макроскопски и микроскопски изпитвания за идентичност. Тези изпитвания са специфични и са включени във фармакопейната монография (статия) за съответната дрога.

2. Съдържание на чужди примеси: Количеството на чужди тела в дрогата не трябва да превишава 2%.

✓ Пробата се разстила на тънък слой и се отделят ръчно чуждите частици. Претеглят се и се определят като процент чужди органични частици от теглото на изследваната дрога.

✓ Необходимо оборудване - аналитична везна.

3. Загуба при сушене - определя се като загуба в масата при сушене на дрогата до постоянно тегло при температура 105°C, изразена в mg/g или масови проценти.

✓ Необходима апаратура: сушилня, аналитична везна.

✓ Ако дрогата е с високо съдържание на етерично масло се допуска определяне на съдържание на вода.

Аналитичен контрол при растителни дроги

4. Пестициди: Използват се различни методи, най-вече GS-MS и LC-MS. Одобрените методи за взимане на проби, пробоподготовка и анализ на пестициди са описани подробно в Документ N° SANCO/10232/2006 "Quality control procedures for pesticide residues analysis"
www.ec.europa.eu/food/plant/resources/qualcontrol_en.pdf

-Тежки метали: Използва се предимно атомно-адсорбционен анализ. Освен ако не са посочени други изисквания, растителните дроги трябва да отговарят на следните показатели:

- Кадмий: макс. 1.0 ppm;
- Олово: макс. 5.0 ppm;
- Живак: макс: 0.1 ppm.

При някои дроги може да се въведат и допълнителни изисквания за други тежки метали.

Аналитичен контрол при растителни дроги

5. Обща пепел:

✓ Описание: Кварцов или платинов тигел се налява до червено в продължение на 30 min и след темпериране в ексикатор се измерва масата му. От 2 до 4 g от изсушената на въздух дрога се разстила равномерно в тигела. Суши се при температура 100-105°C в продължение на 1 час и се налява до постоянна маса в муфелна пещ при 600-625°C, като след всяко наляване тигелът се темперира в ексикатор. Ако след продължително наляване в пепелта все още има черни частици, тя се прехвърля с гореща вода върху безпепелен филтър, филтрува се и остатъкът заедно с филтърната хартия се наляват. Филтърът и пепелта се обединяват, внимателно се изпарява течността до сухо и след това се налява до постоянна маса.

✓ Необходимо оборудване: муфелна пещ, аналитична везна.



Аналитичен контрол при растителни дроги

6. Определяне на екстрактивни вещества -

Екстрактивните вещества представляват количеството сухо вещество, което се извлича с определен разтворител от определено количество дрога при дадени условия. Екстрактивните вещества са важен показател за качеството на дрогите, тъй-като по-ниското им съдържание от изискваното (в съответната фармакопейна монография) е указание за по-ниско качество на тази суровина.

✓ Описание: Около 1 g от дрогата се поставя в конична колба, наливат се 50 ml разтворител, посочен в съответната монография, колбата се затваря със запушалка, притегля се с точност до 0,01 g и се оставя да престои 1 час. След това колбата се свързва с обратен хладник, нагрива се до кипене и се поддържа слабо кипене на течността 2 часа. След охлаждане колбата със съдържимото отново се затваря със запушалката, притегля се и загубата в теглото се допълва със същия разтворител.

Аналитичен контрол при растителни дроги

Съдържанието на колбата се разклаща и се филтрува през сух филтър в суха колба. 25 мл от филтрата се прехвърлят в изсушено и точно претеглено порцеланово блюдо, изпаряват се на водна баня до сухо и блюдото се суши при 100-105°C 3 часа, след което се охлажда в ексикатор и бързо се претегля. Съдържанието на екстрактивните вещества в проценти (X) се изчислява по формулата:

$$X (\%) = \frac{в. \cdot 200}{а}$$

Където:

а - претегленото количество в грамове;

в - увеличението на теглото на блюдото в грамове

✓ Необходима апаратура: техническа везна, аналитична везна, сушилня.







Аналитичен контрол при растителни дроги

7. Други общи методи за анализ на растителни дроги:

- Индекс на набъбване;
- Определяне на афлатоксин В1;
- Определяне на охратоксин А;
- Радиоактивно замърсяване;
- Микробиологично замърсяване;

8. **Определяне на биологично активната съставка** - Това е най-важния показател при аналитичния контрол на всяка дрога. Според Европейската фармакопея, за да бъдат използвани за растителни препарати или лекарствени продукти растителните дроги трябва да съдържат определено минимално количество от целевото биологично активно вещество (БАВ).





Аналитичен контрол при растителни дроги

➤ В зависимост от вида на растителната матрица и най-вече вида на БАВ се използват различни аналитични техники за анализ:

-Спектрофотометрични методи;

-Високоэффективна течна хроматография (HPLC);

- UV-Vis детектор;

- рефрактометричен детектор (RID);

- детектор с диодна матрица (DAD);

- пулсиращ амперометричен детектор (PAD)

- мас-селективни детектори (HPLC-MS)

-Газова хроматография (GC)

- Газова хроматография с мас-селективни детектори (GC-MS);




Аналитичен контрол при растителни дроги

Суша дрога	Активна съставка	Количество, %	Необходимо оборудване
Шипка-плод	Аскорбинова киселина	0.3	Спектрофотометър, $\lambda=520$ nm
Бъз-цвет	Флавоноиди, изразени като еквиваленти кверцетин-3-глюкозид	0.8	Спектрофотометър, $\lambda=425$ nm
Маточина-листа	Розмаринова киселина	1%	HPLC система, C_{18} колона, UV-Vis детектор, $\lambda=330$ nm
Мента-лист: цял нарязан	Етерично масло	0.9 1.2	Апарат за парна дестилация;
Бял трън-плод	Силимарин, изрзен като еквиваленти силибинин	1.5	HPLC система, C_{18} колона, UV-Vis детектор, $\lambda=288$ nm
Хвойна-плод	Етерично масло	1.0	Апарат за парна дестилация
Невен-цвет	Флавоноиди, изразени като еквиваленти хиперозид	0.4	Спектрофотометър, $\lambda=425$ nm

Аналитичен контрол при растителни дроги

Суша дрога	Активна съставка	Количество, %	Необходимо оборудване
Жълт кантарион - цвят	Общо количество хиперицини, изразени като хиперицин	0.08	Спектрофотометър, $\lambda=590$ nm
Теснолист живовлек-листа и стебло	Производни на орто-дихидроксиканекената киселина, изразени като актеозид	1.5	Спектрофотометър, $\lambda=525$ nm
Цариче	Общи танини, изрзени като пирогалол	6.0	Спектрофотометър, $\lambda=760$ nm
Глог-плод	Процианидини, изразени като цинидин хлорид	1.0	Спектрофотометър, $\lambda=545$ nm
Черна боровинка-плод (свеж)	Антоцинини, изрзени като цианидин-3-глюкозид	0.3	Спектрофотометър, $\lambda=528$ nm
Лайка-цвят	Етерично масло; Апигенин-7-глюкозид	0.4 0.25	Апарат за парна дестилация; HPLC система, C_{18} колона, UV-Vis детектор, $\lambda=340$ nm



Пример 1: Аналитичен контрол при суха дрога от жълт кантарион (*Hypericum perforatum*)

1. Определение: Цели или нарязани съцветия от *Hypericum perforatum* L., събрани по време на цъфтеж.

Съдържание: Минимум 0.08% общи хиперицини, изразени като хиперицин ($C_{30}H_{16}O_8$; Mr 504.4) (суха маса).

2. Идентификация:

- Пълно описание на дрогата (цяла);
- Пълно описание на смляната дрога;
- Тънкослойна хроматография (TLC); подробно описание на методиката за тънкослойна хроматография:

3. Аналитични тестове:

3.1. Наличие на чужди тела: Максимум 3% стебла с диаметър по-голям от 5 mm и максимум 2% чужди тела.






Аналитичен контрол при суха дрога от жълт кантарион (*Hypericum perforatum*)


3.2. Загуба при сушене: Максимум 10.0% определени при сушене на 1.000 g смляна дрога при 105 °C за 2 h.

3.3. Обща пепел: Максимум 7.0%.

3.4. Определяне на биологично активната съставка:

- Тестов разтвор: Сложете 0.800 g смляна дрога, 60 mL смес (20 обема вода и 80 обема тетрахидрофуран) и магнитна бъркалка. Загрейте сместа на водна баня под обратен хладник за 30 min. Центрофугирайте (2 min, 700 g) и отделете супернатанта в 250 mL колба. Залейте остатъка с 60 mL смес (20 обема вода и 80 обема тетрахидрофуран) и загрейте отново под обратен хладник за 30 min. Центрофугирайте (2 min, 700 g) и отделете супернатанта. Комбинирайте двата супернатанта и изпарете до сухо. Разтворете сухия остатък с 15 mL метанол с помощта на ултразвук и прехвърлете в 25 mL мерителна колба.





Аналитичен контрол при суха дрога от жълт кантарион (*Hypericum perforatum*)

Изплакнете колбата с метанол, прехвърлете в мерителната колба и долейте с метанол до марката. Центрофугирайте още веднъж, филтрувайте през сириндж филтър (0.2 μm) и изхвърлете първите 2 mL от филтрата. Налейте 5.0 mL от филтрата в мерителна колба и разрежете до 25.0 mL с метанол.

Измерете абсорбцията на тестовия разтвор при 590 nm като за празна проба използвате метанол. Изчислете процента на хиперицини в пробата по следната формула:


$$\frac{A_{x125}}{m \times 870}$$


където:

A - абсорбцията при 590nm

m - масата на дрогата, g

870 - специфична абсорбция на хиперицин при 590 nm.







Растителни препарати и растителни лекарствени продукти


➤ "Растителен препарат" е продуктът, който се получава след екстракция, дестилация, изстискване, фракционизиране, пречистване, концентрация или ферментация на растителна дрога. Растителният препарат може да бъде също стрити или разпрашени растителни вещества, тинктури, **екстракти**, **етерични масла**, преработени растителни течности/сокове.


➤ "Растителен лекарствен продукт" е лекарствен продукт, който съдържа като лекарствени вещества една или повече растителни дроги, или един или повече растителни препарати, или една или повече растителни дроги в комбинация с един или повече растителни препарати.





Стандартизиране на растителни препарати.

- Според Европейската фармакопея за да проявят своето действие растителните екстракти трябва да бъдат стандартизирани на определено съдържание на биологично активната съставка/и, за която се счита, че е отговорна за наблюдавания биологичен ефект.
 - Стандартизирането може да става единствено чрез добавяне на инертни помощни вещества към препаратите или чрез смесване на две партии екстракт с различно съдържание на целевата биологично-активна съставка/и.
 - В аналитичния контрол на растителните препарати се използват същите общи методи за анализ както при растителните дроги.
 - В монографията за съответния препарат задължително се посочват допустимите екстрагенти използвани за тяхното получаване.
- 



Пример 2: Аналитичен контрол при стандартизиран сух екстракт от мента-лист (*Mentha piperita*)

1. Определение: Сух екстракт, получен от листа на мента.

Съдържание: Minimum 0.5% розмаринова киселина ($C_{18}H_{16}O_8$; Mr 360.33) (сух екстракт).

2. Получаване: Екстрактът се получава от растителна дрога чрез **подходяща процедура**, чрез използване на етанол (30-50% V/V) или вода с температура мин. 60 °C.


3. Характеристика:

Външен вид: кафява аморфна пудра.

4. Идентификация:

Тънкослойна хроматография - подробно описание на процедурата.





Пример 2: Аналитичен контрол при стандартизиран сух екстракт от мента-лист (*Mentha piperita*)

5. Анализ на биологично-активната съставка: чрез високоефективна течна хроматография

5.1. Тестов разтвор: Използвайте кафяви стъклени колби. Към 0.400 g от екстракта прибавете 15 mL етанол (50% V/V), приложете ултразвук за 10 min и филтрувайте в 20 mL мерителна колба. Изплакнете колбата с етанол и допълнете до марката със същия солвент.

5.2. Референтен разтвор (a): Разтворете 10.0 mg розмаринова киселина в етанол (50% V/V) и разредете до 100 mL със същия солвент.

5.3. Референтен разтвор (b): Разтворете 5 mg ферулова киселина в референтен разтвор (a) и разредете до 50 mL с етанол (50% V/V).



Пример 2: Аналитичен контрол при стандартизиран сух екстракт от мента-лист (*Mentha piperita*)

5.4 Колона:

- размер: $l = 0.25 \text{ m}$, $\varnothing = 4.6 \text{ mm}$;
- Стационарна фаза: октадецил силика (C_{18}) гел ($5 \mu\text{m}$).

5.5. Мобилна фаза:

- мобилна фаза А: фосфорна киселина, ацетонитрил, вода (1:19:80 V/V/V);
- мобилна фаза В: фосфорна киселина, метанол, ацетонитрил (1:40:59 V/V/V);

- градиент

Време, min	Моб. фаза А, % V/V	Моб. фаза В, % V/V
0-20	100 до 55	0 до 45
20-25	55 до 0	45 до 100
25-30	0 до 100	100 до 0



Пример 2: Аналитичен контрол при стандартизиран сух екстракт от мента-лист (*Mentha piperita*)

5.6. Скорост на потока: 1.2 mL/min.

5.7. Детекция: Спектрофотометрично при 330 nm.

5.8. Обем на инжектираната проба: 20 μ L.

5.9. Ориентировъчни времена на задържане (R_t):

- розмаринова киселина: R_t - около 11 min:

- ферулова киселина - около 0.8 x R_t на розмариновата киселина.

Изчислете количеството на розмариновата киселина по следния начин:

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 0.2}{A_2 \times m_1}$$

Където: A_1 - Площ на пика на розмариновата киселина в хроматограмата, получен от тестовия разтвор.

A_2 - Площ на пика на розмариновата киселина в хроматограмата, получен от референтен разтвор (а).

m_1 - маса на екстракта в грамове.

m_2 - маса на розмариновата киселина в реф. разтвор (а).

p - чистота на розмариновата киселина, %


Пример 3: Аналитичен контрол при стандартизирано масло от хвойна (*Juniperus communis* L)

1. Определение: Етерично масло, получено чрез парна дестилация на узрели, не-ферментирани плодове от *Juniperus communis* L. Допуска се добавката на антиоксидант.

Отговаря на следния състав:

- α -pinene: 20 - 50%,
- sabinene: макс. 20 %,
- β -pinene: 1.0 - 12 %
- β -myrcene: 1.0 - 35 %,
- α -phellandrene: макс. 1.0 %,
- limonene: 2.0 - 12 %,
- terpinen-4-ol: 0.5 - 10 %,
- bornyl acetate: макс 2.0 %,
- β -caryophyllene: макс 7.0 %.





Пример 3: Аналитичен контрол при стандартизирано масло от хвойна (*Juniperus communis* L)

2. Характеристика:

Външен вид: подвижна безцветна или жълтеникава течност.

С характерен аромат.

3. Идентификация:

Тънкослойна хроматография - подробно описание на процедурата.


4. Аналитичен контрол:

4.1. Относителна плътност: 0.857 - 0.876.

4.2. Индекс на пречупване: 1.471 - 1.483.

4.3: Пероксидно число: макс. 20.





Пример 3: Аналитичен контрол при стандартизирано масло от хвойна (*Juniperus communis* L)

5. Хроматографски профил: чрез газова хроматография (GS).

5.1. Тестов разтвор: Разтворете 60 mg от етеричното масло в триметилпентан и разредете до 5 mL със същия разтвор.

5.2. Референтен разтвор: Смесете 25 μL от α -pinene, sabinene, β -pinene, β -myrcene, α -phellandrene, limonene, terpinen-4-ol, bornyl acetate and β -caryophyllene, и разредете до 25.0 mL с триметилпентан.

5.3. Колона:


— материал: капилярна колона от кварцово стъкло;

— размер: $l = 30 \text{ m} - 60 \text{ m}$, $\varnothing = 0.25\text{-}0.53 \text{ mm}$,

— стационарна фаза: poly(dimethyl)(diphenyl)siloxane.

5.4. Носещ газ: хелий за хроматография.

5.5. Скорост на потока 2.0 mL/min.



Пример 3: Аналитичен контрол при стандартизирано масло от хвойна (*Juniperus communis* L)

5.6. Температура:

	Време, min	Температура °C
Колона	0 до 1 1 до 58	60 60 до 230
Инжектор		250
Детектор		250

5.7. Детектор: пламъчно-йонизационен детектор.

5.8. Инжекционен обем: 0.5 μ L.

6. Съхранение: При температура по-ниска от 25°C



Заклучение

➤ Аналитичният контрол при разработване на фитопродукти е необходим за доказване преди всичко на тяхното качество.

➤ Благодарение на описаните във Европейската фармакопея аналитични методи и критериите за допустимост, на които трябва да отговарят фитопродуктите става възможно те да бъдат стандартизирани.

➤ Най-често използваната аналитична апаратура за анализ на биологично активни вещества във фитопродукти са:

- Спектрофотометър;

- Система за високоефективна течна хроматография с UV-Vis детекция;

- Система за газова хроматография (най-вече за анализ на етерични масла).

➤ Освен изброената аналитична апаратура, всяка лаборатория за анализ на фитопродукти трябва да разполага и с редица лабораторни уреди като:



Заклучение

- Техническа везна;
- Аналитична везна;
- Рефрактометър;
- Центрофуга;
- Сушилня;
- Муфелна пещ;
- Вакуум изпарител;
- Вакуум сушилня;
- Лиофилизатор;
- Ултразвукова вана
- рН метър
- Дестилатор
- Система за ултра чиста вода и др.



Благодаря за вниманието !

