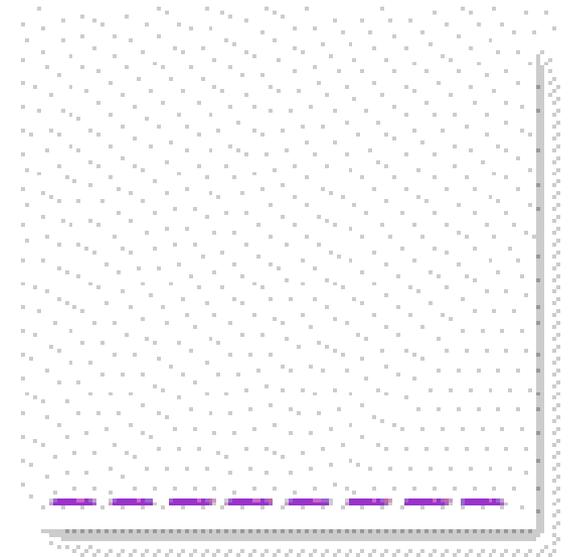


CONTROL DE CALIDAD DE DROGAS VEGETALES



Universidad Central de Venezuela

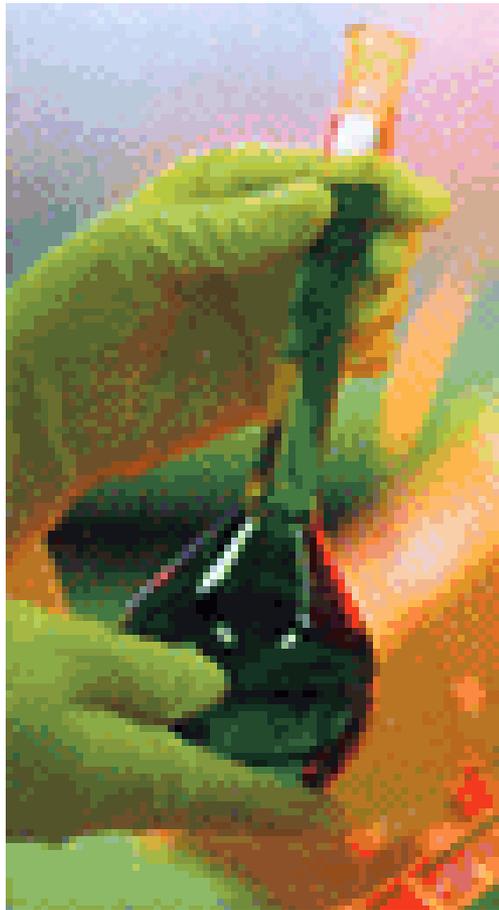
Facultad de Farmacia

Farmacognosia y Medicamentos Herbarios

Prof^a. Nery Margarita Pérez Ibáñez

2013-2014

Control de calidad de drogas vegetales



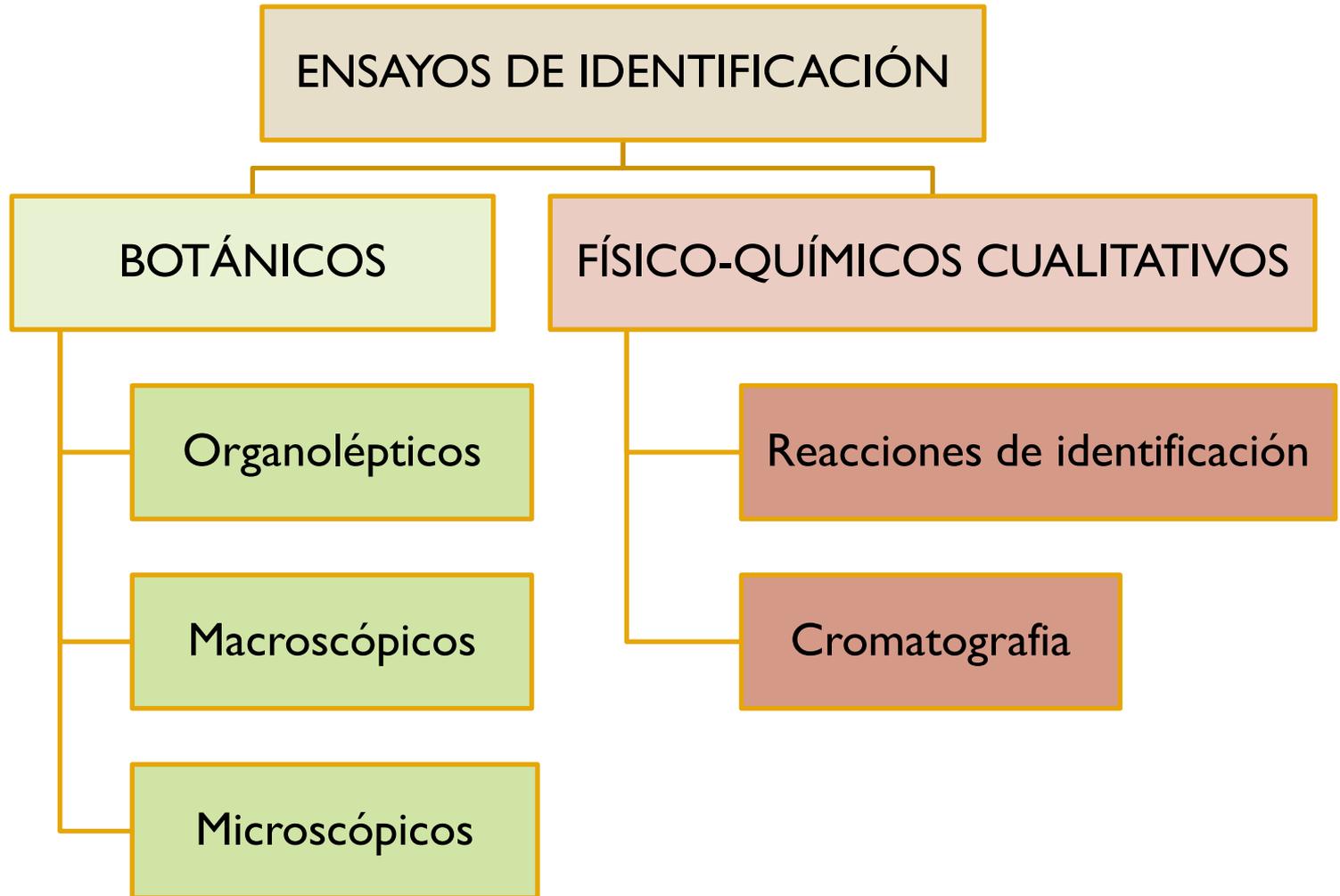
- Las drogas vegetales deben ser sometidas a rigurosos controles (ensayos o pruebas) antes de ser empleadas con fines terapéuticos.
- Estos controles permiten garantizar la CALIDAD de las drogas vegetales.

Control de calidad de drogas vegetales



- **Identificación** del material vegetal permite descartar posibles falsificaciones.
- **Calidad y pureza** permite precisar:
 - el grado de conservación
 - la ausencia de adulterantes
 - la valoración de los principios activos

Control de calidad de drogas vegetales



Ensayos botánicos de drogas vegetales

- Permite detectar falsificaciones.
- Es el punto de partida para los ensayos posteriores.
- Comprenden:
 1. Estudio de las características organolépticas
 2. Estudio macroscópico
 3. Estudio microscópico

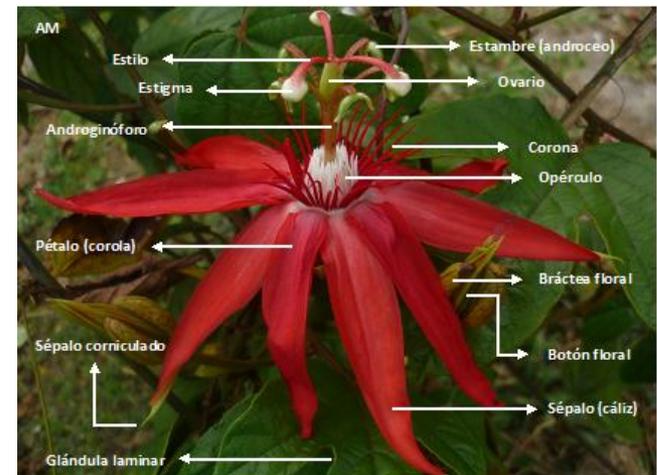
Estudio de las características organolépticas de la droga vegetal

- Se utilizan los órganos de los sentidos.
- Es el examen preliminar de la droga.
- Se evalúa el olor, sabor, ocasionalmente el ruido o chasquido de su fractura y la sensación al tacto.
- Términos generales empleados:
 - Olor: aromático, característico
 - Color: uniforme
 - Sabor: dulce, amargo, ácido, salino, astringente.
- Suficiente para identificar **drogas enteras** junto al estudio morfológico.



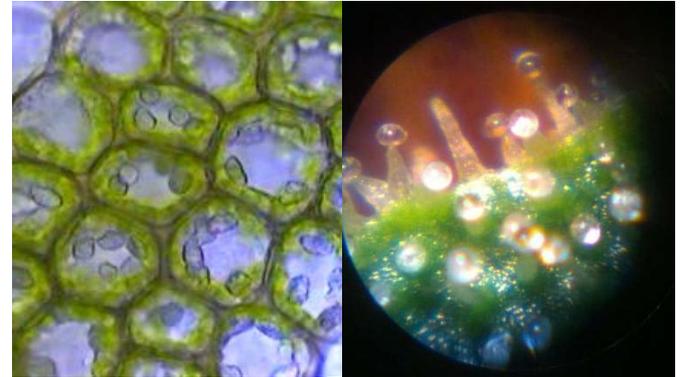
Estudio macroscópico de la droga vegetal

- Se basa en la observación minuciosa de las características morfológicas propias de cada órgano, por ejemplo:
 - Tallos: tipo, disposición de las hojas, nudos, etc.
 - Hojas: forma del limbo, tipo de nervación, textura, etc.
 - Flores: número de pétalos, sépalos, estambres, etc.
 - Semillas: tamaños, color, forma, etc.



Estudio microscópico de drogas vegetales

- Se fundamenta en el reconocimiento de:
 - componentes celulares
 - contenido celular
- Permite descartar adulterantes
- Indispensable para **drogas pulverizadas**



Ensayos físico-químicos cualitativos de drogas vegetales

- Se fundamentan en la caracterización de compuestos específicos derivados del metabolismo secundario (alcaloides, flavonoides, terpenos, etc.)
- Se realizan a drogas vegetales (enteras , trozadas y pulverizadas) y también a extractos obtenidos de la planta
- Métodos:
 - Reacciones de identificación
 - Cromatografía



Reacciones de identificación de drogas vegetales

- Estos ensayos son específicos de algún principio activo o componente característico.
- Son sencillos y rápidos.
- Se basan en:
 - **Reacciones de coloración**
(Cáscara sagrada + sol. amoniacal = color rojo)
 - **Reacciones de precipitación**
(Alcaloides + metales pesado = precipitado)
 - **Fluorescencia**
(Quinina + sol. dil. de H_2SO_4 = solución fluorescente)



Ensayos cromatográficos

- Técnicas de separación y aislamiento de compuestos.
- Estas técnicas se basan en la *afinidad* de las sustancias presentes en una mezcla a las dos fases:
 - *fase estacionaria*, que permanece fija y puede ser sólida o líquida,
 - *fase móvil*, que eluye a través de la primera y puede ser un líquido o un gas
- Las técnicas cromatográficas más utilizadas:
 - Cromatografía de capa fina (CCF)
 - Cromatografía de columna (CC)
 - Cromatografía de gases (CG)
 - Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR ó HPLC)

Cromatografía de capa fina

- Se fundamenta en el fenómeno físico de adsorción.
- El adsorbente (fase estacionaria) más empleado es sílicagel.
- Los disolventes (fase móvil) más frecuentemente utilizados: cloroformo, diclorometano, éter etílico, acetato de etilo y mezclas de ellos.
- Detección de los compuestos:
 - Visible
 - UV_{254nm} (*onda corta*)
 - UV_{365nm} (*onda larga*)
 - Atomizando la placa con reactivos químicos

Cromatografía de capa fina (CCF)

El proceso de análisis por cromatografía de capa fina

La cromatografía en capa fina (TLC, Thin Layer Chromatography) es una técnica de análisis químico utilizada para separar sustancias puras de mezclas complejas. Es una de las técnicas más comunes empleadas en un laboratorio. Entre otras cosas, permite determinar el grado de pureza de un compuesto y comparar muestras.

1 Preparación del material



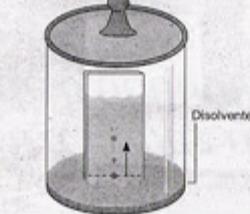
Se disuelve la muestra para dejarla en estado líquido y se prepara un tubo capilar. Se prepara al mismo tiempo una placa de celulosa absorbente y se dibuja una línea de base a un par de centímetros del borde inferior.

2 Aplicación de la muestra



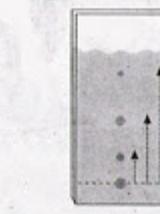
Con el tubo capilar, y usando la línea de base, se aplica una gota de la muestra en la placa de celulosa, procurando que se extienda lo menos posible y que no dañe la capa. A continuación, se deja secar.

3 Elución



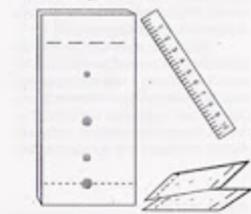
La muestra se introduce en una cubeta con un disolvente. Se espera que el disolvente ascienda por capilaridad hasta unos 2-3 cms. de la parte superior. Este arrastra la muestra a su paso, separando sus componentes.

4 Separación



Las distintas moléculas tienen distintas masas, por lo que se mueven a velocidades diferentes y alcanzan alturas diferentes sobre la placa, creando un patrón. Existen patrones estándar para casi todas las sustancias habituales.

5 Secado y análisis



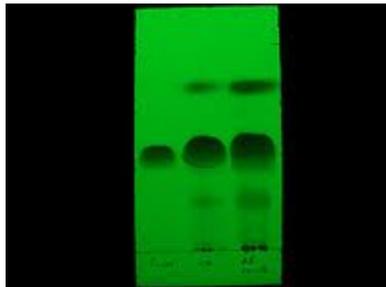
Se saca la placa de la cubeta y se marca la altura a la que ha llegado el disolvente. Se deja secar la placa y se mide la distancia recorrida por los componentes de la muestra, comparándola con los patrones establecidos.

FUENTE: College of Wooster.

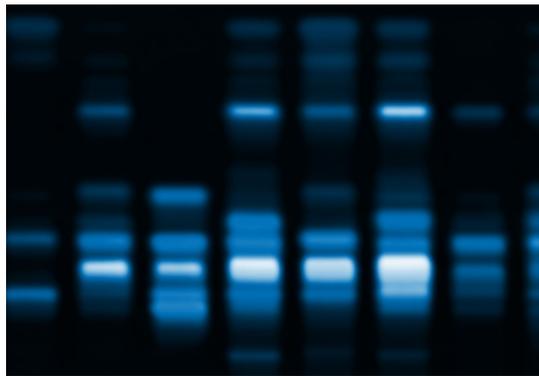
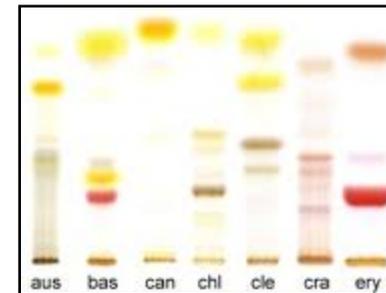
V.C. / EL MUNDO

Cromatografía de capa fina. Detección

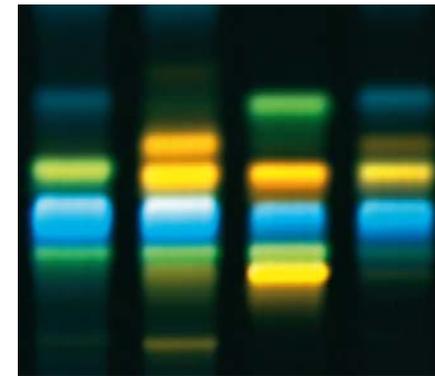
UV 254 nm



VIS (con reactivo)

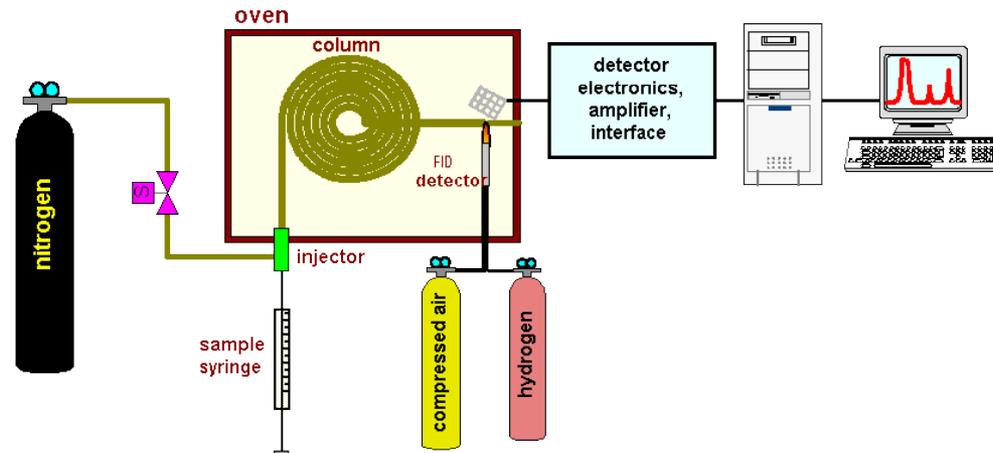


UV 365 nm



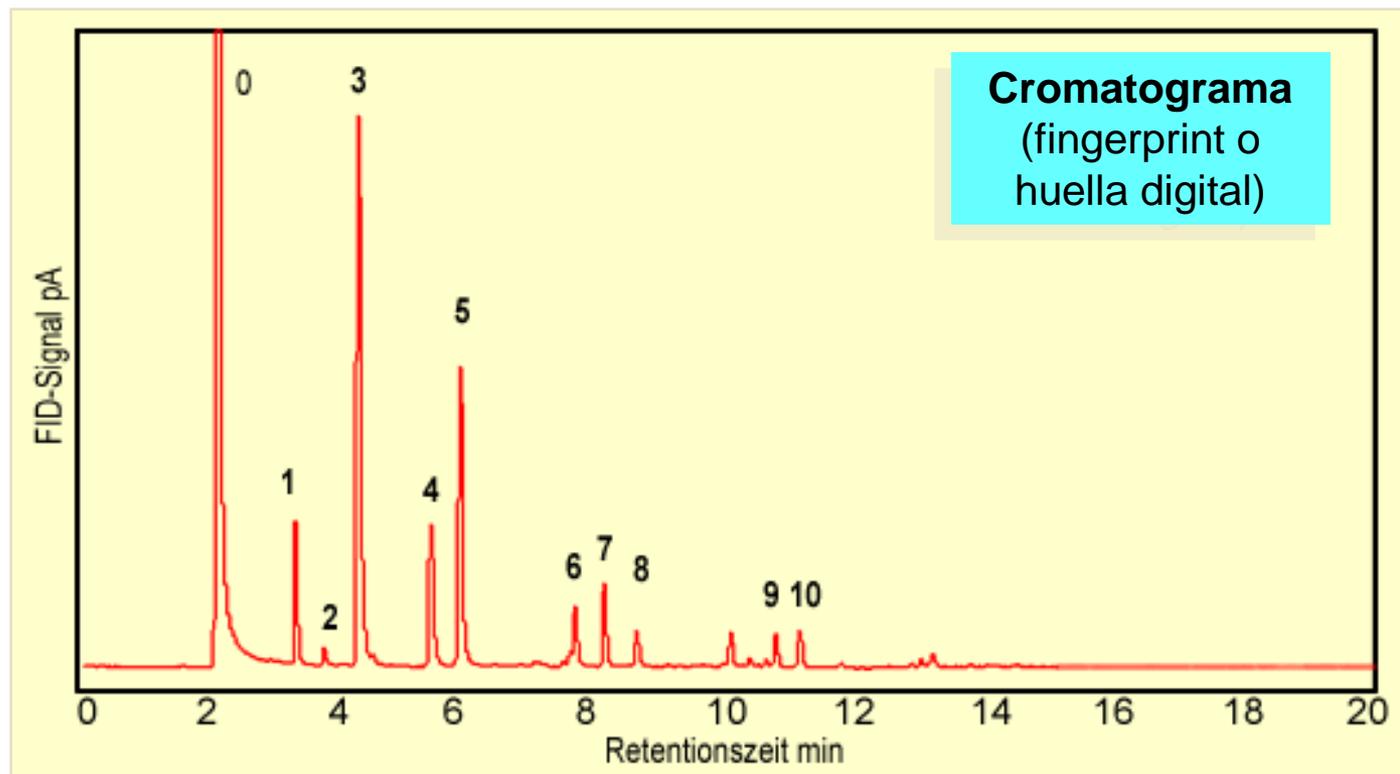
UV365 nm (con reactivo)

Cromatografía de gases (CG)



- Se fundamenta en el fenómeno físico de adsorción.
- La fase estacionaria (5-15% silicona) esta contenida en una columna. Necesita una fuente de calor (horno). La fase móvil es un gas inerte (nitrógeno).
- Utilizada principalmente en estudio de las drogas vegetales con componentes volátiles.
- Permite identificar aceites esenciales, ácidos grasos, resinas, etc.
- Proporciona información cualitativa y cuantitativa

Determinación por CG del aceite esencial de las hojas de melisa (*Melissa officinalis*) (BF 2000)



Pico 0: Metanol

Pico 1: Limoneno

Pico 2: Linalol

Pico 3: Citronelal

Pico 4: Citronelol

Pico 5: Geraniol

Pico 6: Acetato de citronelal

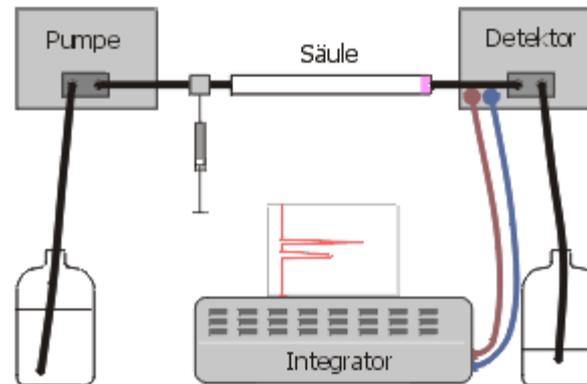
Pico 7: 3,7-Dimetil-trans-2,6-octadien-1-il acetato

Pico 8: Elemeno;

Pico 9: d-Cadineno

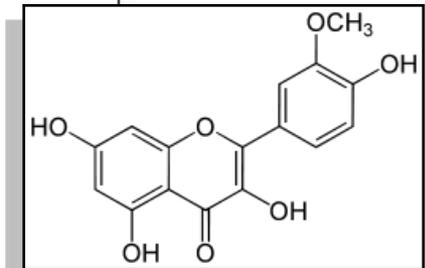
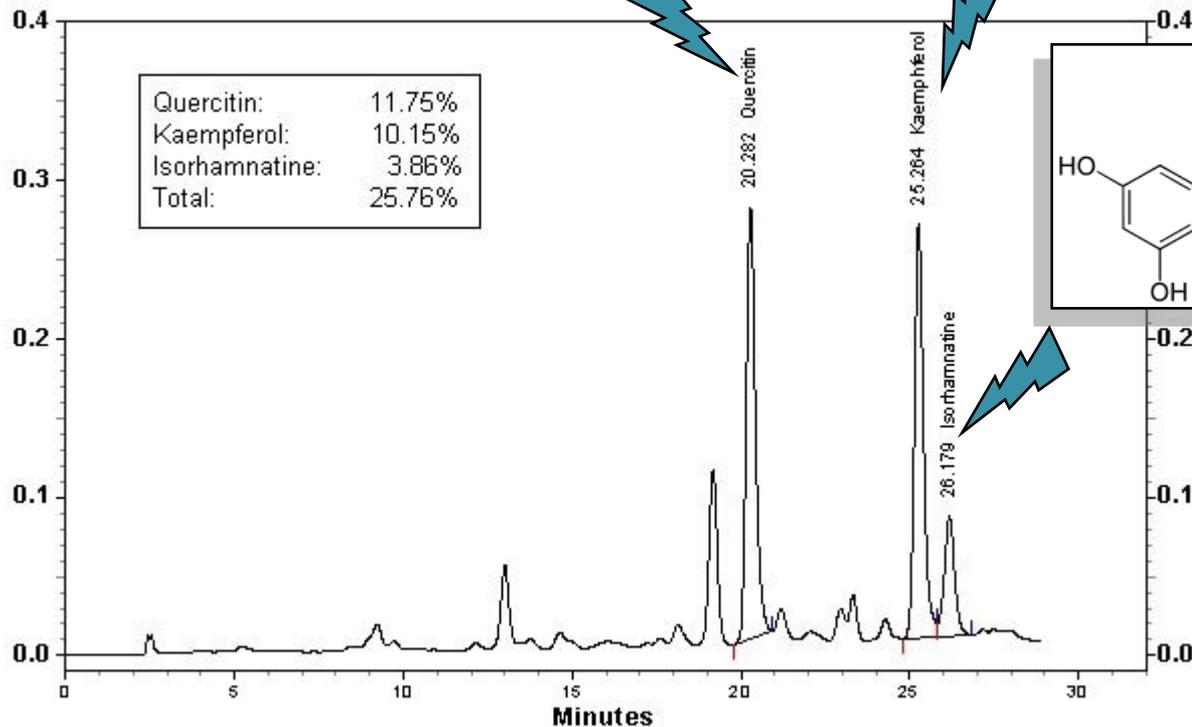
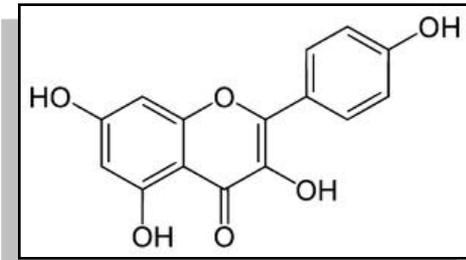
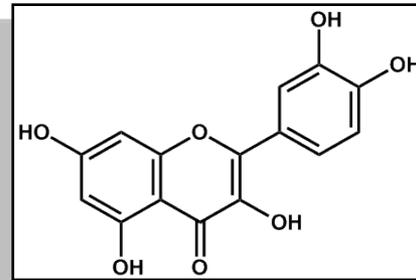
Pico 10: Elemol

Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR ó HPLC)



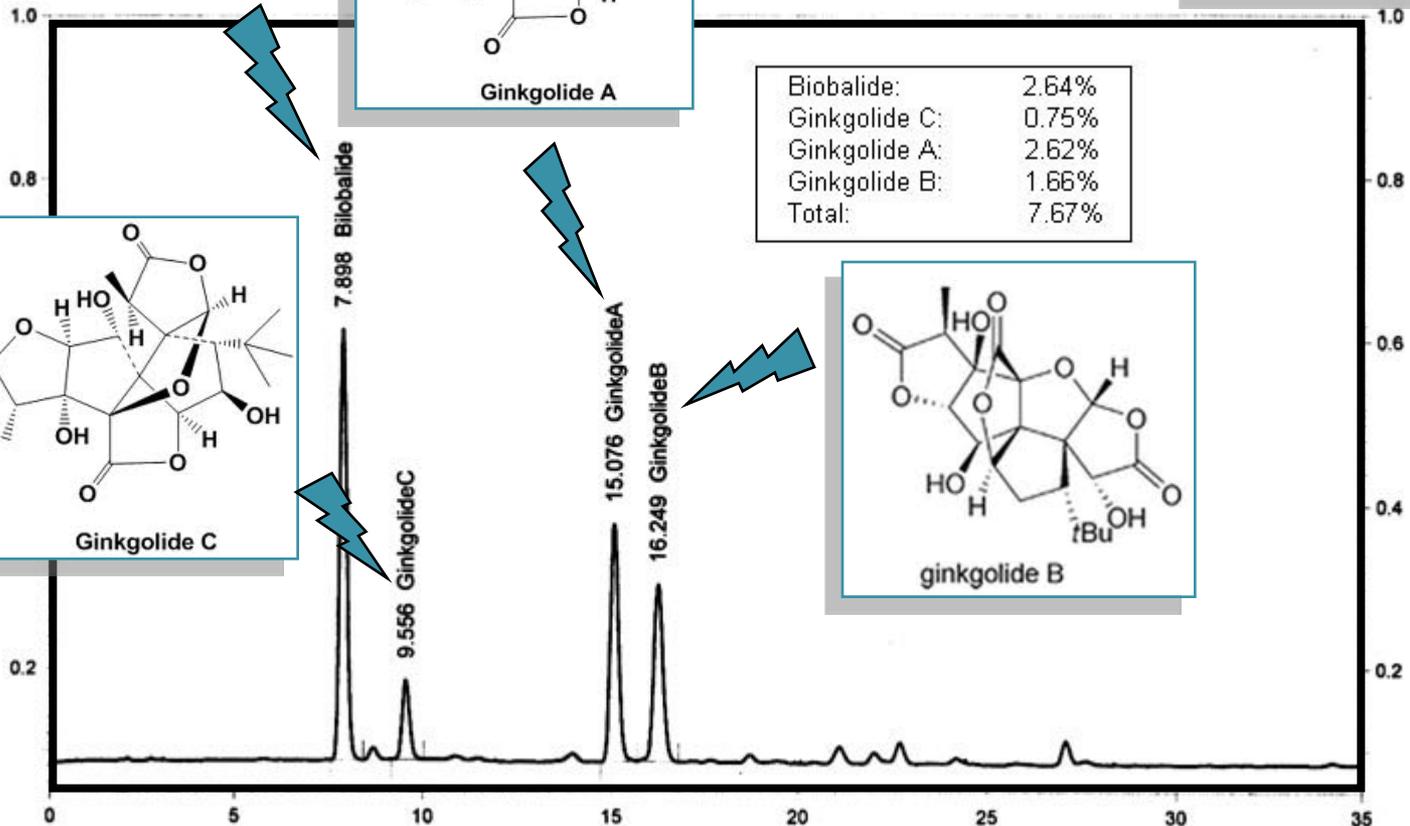
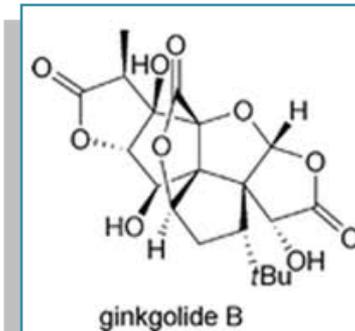
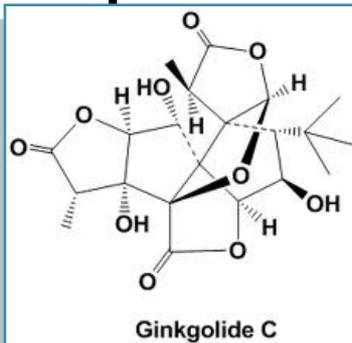
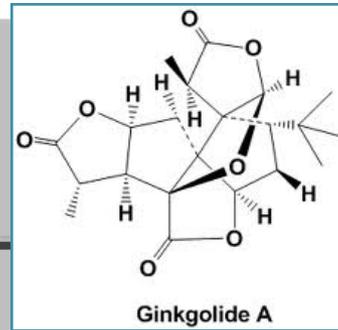
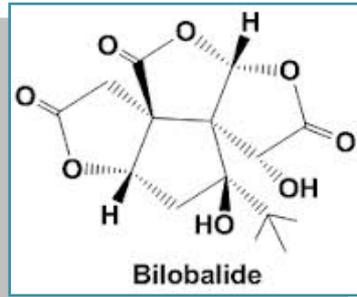
- La fase estacionaria esta contenida en una columna, la cual puede ser de adsorción, reparto, fase reversa, gel de filtración, intercambio iónico y afinidad.
- La fase móvil por lo general es una mezcla de disolventes, cuya proporción permanecen constante (*isocrático*) o puede variar en función del tiempo (*gradiente*).
- La fase móvil fluye a través de la columna a una considerable presión.
- **Utilizada principalmente con productos no volátiles (terpenoides, fenoles, alcaloides, lípidos, azúcares).**
- **Proporciona información cualitativa y cuantitativa**

Determinación por HPLC de los flavonoides presentes en el extracto seco estandarizado de las hojas de *Ginkgo biloba*



Cromatograma
(fingerprint o
huella digital)

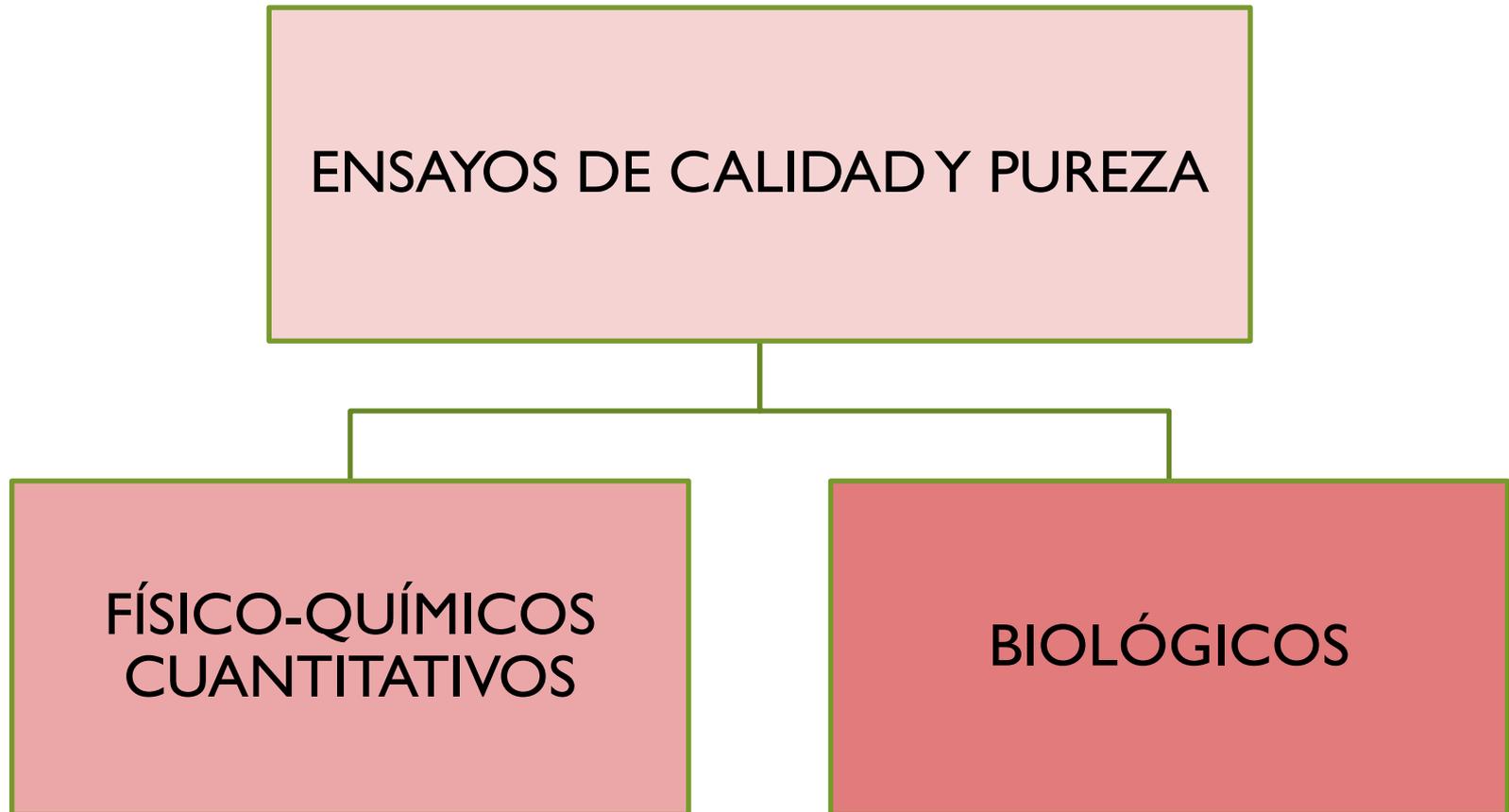
Determinación por HPLC de los ginkgólidos presentes en el extracto seco estandarizado de las **hojas de *Ginkgo biloba***



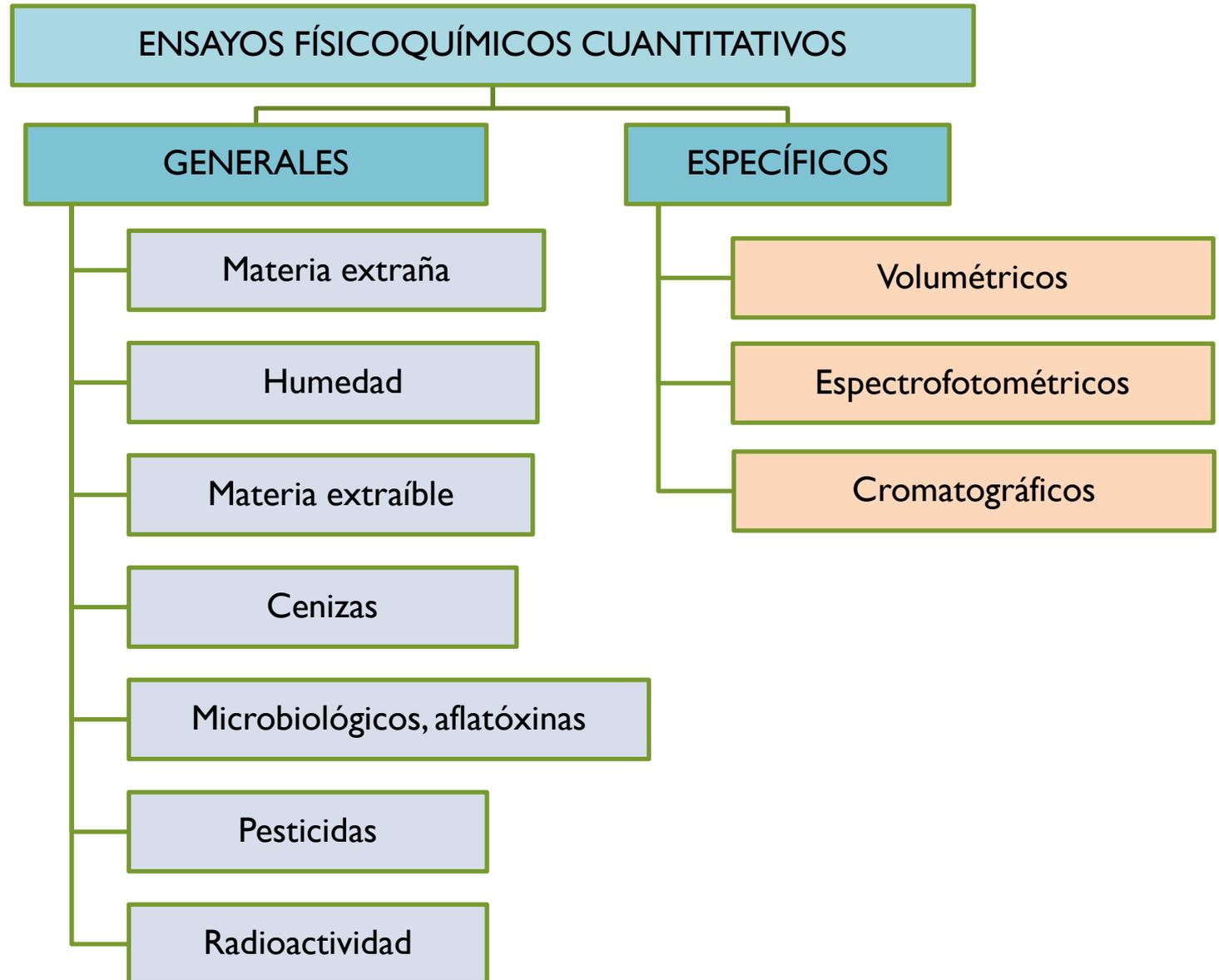
Determinación de la calidad y pureza de drogas vegetales

- La calidad y pureza para una droga vienen determinadas por los patrones o estándares (valores numéricos) dados en la farmacopea o tratados oficiales (Farmacopea Europea, Farmacopea Británica, etc).
- Las drogas vegetales que no reúnan las especificaciones o requisitos exigidos deben ser rechazadas.

Control de calidad de drogas vegetales



Control de calidad de drogas vegetales



Ensayos fisicoquímicos de drogas vegetales

- **Generales**
 - Aplicables a cualquier droga vegetal
 - No valoran o cuantifican los principios activos relacionados con la actividad biológica
- **Específicos**
 - Aplicables a drogas vegetales específicas
 - Valoran o cuantifican los principios activos relacionados con la actividad biológica

Determinación de materias extrañas de drogas vegetales

- Se refiere a partes de otros órganos de las plantas o de otras materias orgánicas.
- El porcentaje máximo permitido es de un 2%.
- No se permite la presencia de materia orgánica como insecto, moho, excremento de animales, pelos, etc.



Determinación de la humedad de drogas vegetales

- Humedad es la cantidad de agua libre que contiene la droga vegetal.
- El contenido de agua debe ser por lo general inferior a un 10 % para una buena conservación.
- Métodos más utilizados:
 - **Gravimétrico**
 - **Volumétrico**

Métodos gravimétricos

- Permite la determinación de la humedad o pérdida de agua por *desección* en una estufa.
- Consiste en calentar una muestra de la droga vegetal homogénea, previamente triturada y pesada, a una temperatura de 105°C hasta peso constante.
- Útil para drogas vegetales que no contiene sustancias volátiles.



Métodos volumétricos

- Permite la determinación del contenido en agua por *arrastre azeotrópico*.
- El agua de la droga vegetal es arrastrada por destilación con un disolvente no miscible con el cual forma una mezcla *azeotrópica* cuando se somete a una temperatura constante de ebullición, en un aparato de destilación a reflujo. Los vapores *azeotrópicos* se condensan por refrigeración, separándose el agua del disolvente en dos capas, pudiendo entonces medir el volumen de agua separada de la droga.
- Se aplica sobre todo en drogas vegetales que contenga aceites volátiles.

Aparato de Clevenger

Materia extraíble

- Este método determina la cantidad de constituyentes activos extraíbles con solventes de una cantidad determinada de la droga vegetal.
- Se calcula el contenido de materia extraíble en mg por g de material vegetal secado al aire.
- Se emplea en drogas vegetales, las cuales no existen ensayos químicos ni biológicos adecuados.
- Métodos:
 - Extracción en caliente (reflujo)
 - Maceración en frío

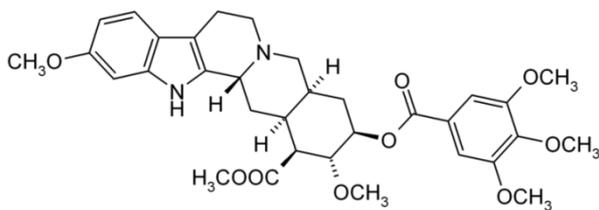
Determinación de cenizas

- La ceniza se refiere al residuo obtenido después de *ignición* de la droga vegetal.
- La ceniza está compuesta por: carbonatos, fosfatos, cloruros y sulfatos mayormente de sodio, potasio, magnesio, calcio, hierro, sílica y silicatos.
- Indica la presencia de adulterantes inorgánicos e inadecuados procesos de recolección y almacenamiento.
- Métodos:
 - **Cenizas totales**
 - Cenizas fisiológicas (minerales propios de la planta) y no fisiológicas (tierra, arena)
 - **Cenizas sulfatadas totales**
 - Metales sulfatados (más estables al calor, resultados más precisos)
 - **Cenizas insolubles en ácido**
 - Tierra silíceas y sílica (arena).



Ensayos físico-químicos cuantitativos específicos

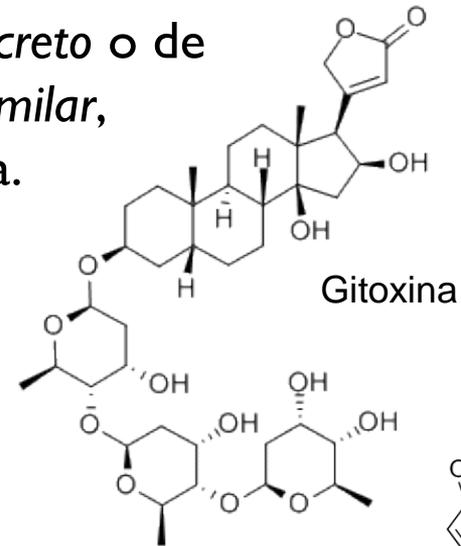
- Permiten valorar el (o los) principio(s) activo(s) de una droga vegetal.
 - Cuantificación de *un principio activo concreto* o de *un conjunto de sustancias de estructura similar*, responsables de la actividad terapéutica.



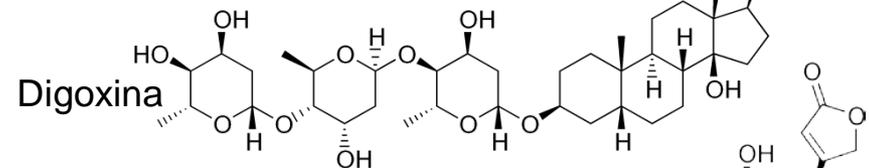
Reserpina
(*Rauwolfia serpentina*)



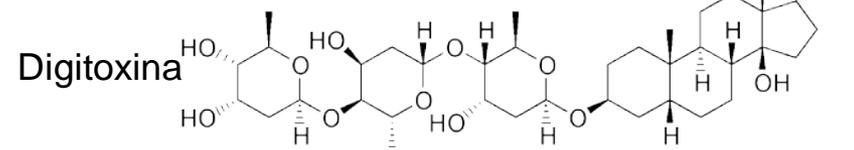
Digitalis purpurea



Gitoxina



Digoxina



Digitoxina

Métodos para la valoración de drogas vegetales

- Se basan en reacciones químicas características de la función química de la sustancia a valorar.
- Métodos:
 - Volumétricos
 - Espectrofotométricos
 - Cromatográficos

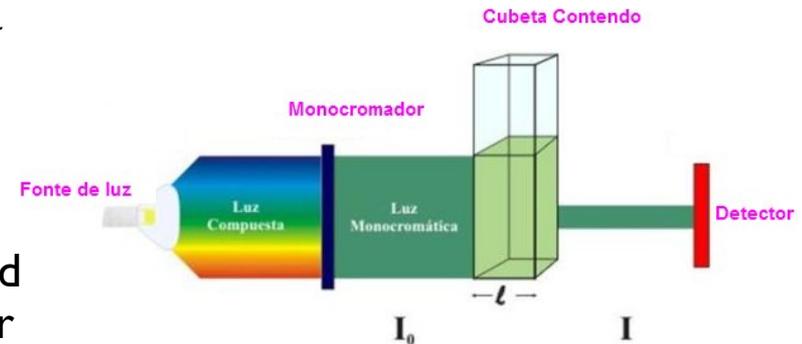
Métodos volumétricos

- Se fundamenta en la determinación de una sustancia por su reacción con un volumen medido de una sustancia estandarizada conocida. Este proceso se llama *titulación*.
- La reacción química sucede de manera estequiométrica o regulada, en presencia de un indicador que puede producir cambios en el color, cambios en conductividad eléctrica, cambios en el potencial eléctrico de la solución u otros cambios físicos.
- Ejemplos:
 - Titulación ácido-base de **alcaloides** en la corteza de quina (*Cinchona sp.*) o en hojas de belladona (*Atropa belladonna*).



Métodos espectrofotométricos

- Están basados en la capacidad de absorción energética que presentan ciertas moléculas al ser expuestas a una determinada intensidad de energía y con una longitud de onda determinada, de forma que la concentración de una solución problema depende exclusivamente de la absorción de energía radiante por ese sistema, y que se denomina *absorbancia* (Ley de Beer, Lambert y Bouguer).
- Ejemplos:
 - **Flavonoides** totales en flores de pasiflora (*Passiflora incarnata*) (BF 2000)
 - **Derivados hidroxiantracénicos** totales en corteza de cáscara sagrada (*Rhamnus purshianus*) (BF 2000).



Ensayos biológicos de drogas vegetales

- Son realizados en animales vivos u órganos intacto o seccionados.
- Determinan la potencia de la droga vegetal o su preparado.
- Se caracterizan por ser más selectivos y sensibles que los fisicoquímicos pero son más caros, requieren largo tiempo para su realización y son menos exactos, ya que dependen de muchos factores que pueden condicionar la respuesta obtenida.



Ensayos biológicos de drogas vegetales

- Los ensayos biológicos son empleados cuando:
 - Las drogas son muy potentes (Digital)
 - El principio activo es complejo o difícil de separar, por ejemplo: glicósidos cardiotónicos, saponinas, etc.
 - Los ensayos físico-químicos son insuficientes para determinar el valor terapéutico, porque no indican la verdadera actividad de la droga o bien no son lo suficientemente específico.
- Actualmente el empleo de estos ensayos ha disminuido debido al avance en las técnicas analíticas que permiten de manera sencilla y fácil la valoración precisa de las drogas vegetales.

Cape Aloes

Cape Aloes complies with the requirements of the 3rd edition of the European Pharmacopoeia [0258]. These requirements are reproduced after the heading 'Definition' below.

Action and use Laxative.

Preparation

Standardised Aloes Dry Extract

DEFINITION

Cape aloes consists of the concentrated and dried juice of the leaves of various species of *Aloe*, mainly *Aloe ferox* Miller and its hybrids. It contains not less than 18.0 per cent of hydroxyanthracene derivatives, expressed as barbaloin (C₂₁H₂₂O₉; Mr 418.4) and calculated with reference to the dried drug.

CHARACTERS

Dark brown masses tinged with green and having a shiny conchoidal fracture, or a greenish-brown powder, soluble in hot alcohol, partly soluble in boiling water, practically insoluble in ether.

IDENTIFICATION

- A. Examine the chromatograms obtained in the test for *Aloe barbadensis*. The chromatogram obtained with the test solution shows in the central part a zone of yellow fluorescence (barbaloin) similar in position to the zone corresponding to barbaloin in the chromatogram obtained with the reference solution and in the lower part two zones of yellow fluorescence (aloinosides A and B) and a zone of blue fluorescence (aloesine).
- B. Shake 1 g of the powdered drug with 100 ml of boiling water R. Cool, add 1 g of talc R and filter. To 10 ml of the filtrate add 0.25 g of disodium tetraborate R and heat to dissolve. Pour 2 ml of the solution into 20 ml of water R. A yellowish-green fluorescence appears which is particularly marked in ultraviolet light at 365 nm.
- C. To 5 ml of the filtrate obtained in identification test B add 1 ml of freshly prepared bromine water R. A yellow precipitate is formed. The supernatant liquid is not coloured violet.

TESTS

Examine by thin-layer chromatography (2.2.27), using silica gel G R as the coating substance.

Test solution. To 0.25 g of the powdered drug add 20 ml of *methanol R* and heat to boiling in a water-bath. Shake for a few minutes and decant the solution.

Store at about 4°C and use within 24 h.

Reference solution. Dissolve 25 mg of *barbaloin R* in *methanol R* and dilute to 10 ml with the same solvent.

Apply separately to the plate as bands 20 mm by not more than 3 mm 10 µl of each solution. Develop over a path of 10 cm using a mixture of 13 volumes of *water R*, 17 volumes of *methanol R* and 100 volumes of *ethyl acetate R*. Allow the plate to dry in air, spray with a 100 g/l solution of *potassium hydroxide R* in *methanol R*. Heat the plate at 110°C for 5 min and examine in ultraviolet light at 365 nm. The chromatogram obtained with the test solution shows no zone of violet fluorescence just below the zone corresponding to barbaloin.

Loss on drying (2.2.32). Not more than 10.0 per cent, determined on 1.000 g of the powdered drug by drying in an oven at 100°C to 105°C.

Total ash (2.4.16). Not more than 2.0 per cent.

ASSAY

Carry out the assay protected from bright light.

Introduce 0.400 g of powdered drug (180) into a 250 ml conical flask. Moisten with 2 ml of *methanol R*, add 5 ml of *water R* warmed to about 60°C, mix, add a further 75 ml of *water R* at about 60°C and shake for 30 min. Cool, filter into a volumetric flask, rinse the conical flask and filter with 20 ml of *water R*, add the rinsings to the volumetric flask and dilute to 1000.0 ml with *water R*. Transfer 10.0 ml of this solution to a 100 ml round-bottomed flask containing 1 ml of a 600 g/l solution of *ferric chloride R* and 6 ml of *hydrochloric acid R*. Heat in a water-bath under a reflux condenser for 4 h, with the water level above that of the liquid in the flask. Allow to cool, transfer the solution to a separating funnel, rinse the flask successively with 4 ml of *water R*, 4 ml of 1M *sodium hydroxide* and 4 ml of *water R* and add the rinsings to the separating funnel. Shake the contents of the separating funnel with three quantities, each of 20 ml, of *ether R*. Wash the combined ether layers with two quantities, each of 10 ml, of *water R*. Discard the washings and dilute the organic phase to 100.0 ml with *ether R*. Evaporate 20.0 ml carefully to dryness on a water-bath and dissolve the residue in 10.0 ml of a 5 g/l solution of *magnesium acetate R* in *methanol R*. Measure the absorbance (2.2.25) at 512 nm using *methanol R* as the compensation liquid.

Calculate the percentage content of barbaloin from the expression:

$$A \times 19,6/m$$

.e. taking the specific absorbance of hydroxyanthracene derivatives, as barbaloin, to be 255.

A = absorbance at 512 nm,

m = mass of the substance to be examined in grams.

STORAGE

Store in an airtight container, protected from light.

Referencias bibliográficas

- Sharpin N., 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos, Vol. 78 de Ciencia y tecnología. Convenio Andrés Bello.
- Villar del Fresno A., 1999, Farmacognosia General. 1ª ed. Editorial Síntesis, S.A.
- WHO, 1998. Quality control methods for herbal materials. Updated edition of Quality control methods for medicinal plant materials.