
| | | | | |
|-------------|-----------|---------|--------------|----------------|
| LEK. SIROV. | God. XXXV | Broj 35 | Str. 53 – 60 | Beograd 2015. |
| LEK. SIROV. | Vol. XXXV | No. 35 | Pp. 53 – 60 | Belgrade 2015. |

Pregledni rad – Review paper

UDC: 615.322.014.4

COBISS.SR-ID 220241676

Rukopis primljen: 14.12.2015.

Prihvaćen za publikovanje: 17.12.2015.

ISPITIVANJE STABILNOSTI BILJNIH PREPARATA

**Nada Ćujić¹, Svetlana Ibrić², Dubravka Bigović¹,
Nebojša Noveski¹, Katarina Šavikin¹**

¹Institut za proučavanje lekovitog bilja dr „Josif Pančić“, Tadeuša Koćuška 1, 11000 Beograd, Srbija

²Farmaceutski fakultet, Institut za farmaceutsku tehnologiju, Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija

IZVOD

Danas, sve je veći akcenat na upotrebi preparata na bazi lekovitog bilja (fitopreparata), kako u prevenciji tako i u lečenju različitih oboljenja. Biljni preparati su prepoznati kao odličan izvor bioaktivnih komponenti, koji imaju pozitivne efekte na zdravlje ljudi. Pored čajeva, kao standardnih biljnih proizvoda, danas su na tržištu mnogo više zastupljeni fitopreparati kao finalne farmaceutske forme. Fitopreparati moraju biti standardnog kvaliteta, što podrazumeva da moraju biti fizički, hemijski i mikrobiološki stabilni, da su standardizovanog sastava i da su visokog stepena čistoće. U cilju utvrđivanja koliko je jedan proizvod stabilan, definisanja uslova čuvanja, određivanja roka trajanja, sprovode se ispitivanja stabilnosti, koja podrazumevaju ispitivanja uticaja faktora okoline: temperature, relativne vlažnosti vazduha, svetlosti na promenu kvaliteta gotovog proizvoda. Ispitivanja stabilnosti se izvode u različitim fazama razvoja i proizvodnje. U skladu sa zahtevima EMEA (Evropska agencija za lekove i medicinska sredstva) za različite biljne preparate postavljaju se različiti specifični testovi stabilnosti.

Ključne reči: stabilnost, biljni lek, fitopreparat, ekstrakt.

UVOD

Svetska Zdravstvena Organizacija (WHO) navodi da 4 biliona ljudi, tj. 80% svetske populacije koristi preparate na bazi bilja u nekom vidu primarne zdravstvene zaštite [1]. U svetu sve više postoji tendencija korišćenja preparata na bazi lekovitog bilja (fitopreparata), kako u prevenciji tako i u lečenju različitih oboljenja. Pored čajeva, na tržištu su fitopreparati mnogo više zastupljeni kao finalne farmaceutske forme standardnog kvaliteta [2]. Svetska Zdravstvena Organizacija (WHO) i Evropska Agencija za lekove (EMA) su dale smernice koje definišu kriterijume za kvalitet (quality), bezbednost (safety) i efikasnost (effectiveness) biljnih lekova, a koje su polazna osnova za definisanje nacionalne regulative [1].

U cilju ispunjenja navedenih uslova, poslednjih godina u svetu, sve se više se pooštavaju propisi i zahtevi koji se odnose na proizvodnju i kvalitet fitopreparata. Najznačajniji aspekti su oni koji se odnose na: proizvodnju, kontrolu i pripremu specifikacije i na kraju stabilnost [1].

Pored čajeva, koji kao mešavine biljnih droga predstavljaju tehnološki najjednostavnije forme, fitopreparati se izrađuju primenom savremenih tehnoloških postupaka i ugradnjom ekstraktivnih proizvoda u različite finalne farmaceutske oblike, čime se obezbeđuje:

- Viši nivo standarizacije
- Jednostavnija primena za pacijente
- Preciznije doziranje

Lekovito bilje i proizvodi na bazi lekovitog bilja su vrlo osetljivi materijali na prisustvo povišene temperature i relativne vlage i podložni su reakcijama oksidacije, degradacije, hidrolize, evaporacije (kod lako isparljivih frakcija iz etarskih ulja), te se pri izradi fitopreparata mora obratiti pažnja na veliki broj faktora koji mogu uticati na kvalitet finalnog proizvoda [3, 4].

Aktivne supstance, biljne droge i ekstrakti moraju biti standardnog kvaliteta što podrazumeva da su fizički, hemijski i mikrobiološki stabilni, da su standardizovanog sastava i da su visokog stepena čistoće. Pomoćne supstance (ekcipienti) takođe moraju biti visokog kvaliteta [4-6].

Finalni farmaceutski oblik mora biti odabran i koncipiran u toku faze razvoja formulacije (formulaciona istraživanja) kao najoptimalnija i najstabilnija kombinacija aktivnih supstanci i pomoćnih materija [2]. Proizvodni uslovi moraju biti u skladu sa zahtevima dobre proizvođačke prakse (DPP) [7]. Tehnološki postupak proizvodnje mora biti reproduktivan a analitički postupci i metode ispitivanja i standardizacije fitopreparata moraju biti visokoselektivni i validirani [3,7].

Za razliku od dobro definisanih sintetskih supstanci, biljni preparati imaju sledeće osobine [1, 8-10]:

- često su nepoznati aktivni principi

- standardizacija, stabilnost i kontrola kvaliteta nisu lako izvodljivi
- problem raspoloživosti i kvaliteta polaznog materijala
- retke su kontrolisane kliničke i toksikološke studije koje dokazuju njihovu efikasnost i bezbednost

Da bi se biljni preparati primenili u odgovarajućem farmaceutskom obliku, prikladnom za terapijsku primenu, neophodno je sprovesti [2-4]:

- preformulaciona istraživanja
- razvoj formulacije
- utvrditi mehanizam oslobađanja aktivne komponente iz preparata
- ispitati efikasnost i bezbednost
- uraditi studije stabilnosti

Kvalitet fitopreparata zavistan je od niza faktora, a pre svega od kvaliteta ulaznih sirovina, vođenja proizvodnog procesa, kontrole u toku proizvodnog procesa. Kvalitet se postavlja, definiše i proverava putem ustanovljenog dokumenta označenog kao specifikacija proizvoda. Specifikacija predstavlja skup testova, referentnih analitičkih i bioloških procedura i postupaka ispitivanja kao i ustanovljenih kriterijuma prihvatljivosti kod primenjenih testova, a sve u cilju ocene proizvoda [11]. Pre svega se specifikacijom definiše kvalitet biljne droge, ekstraktivnog preparata i fitopreparata ali ukazuje na svojstva koja potvrđuju da je proizvod bezbedan i efikasan. Specifikacija predstavlja važnu komponentu obezbeđivanja kvaliteta, jer zadati kriterijumi prihvatljivosti služe da osiguraju kvalitet biljne droge, ekstraktivnog preparata i fitopreparata pri puštanju, kao i u toku trajanja. Sve ovo je neophodno kako bi se obezbedila stalna proizvodnja biljnih droga, ekstraktivnih preparata i fitopreparata visokog kvaliteta [3, 9-12]. Stabilnost se definiše kao period u toku koga proizvod ostaje u zadatim granicama kvaliteta propisanim specifikacijom [3, 4, 9-11]. Kao rezultat nestabilnosti, odnosno interakcija i inkompatibilija između aktivne supstance, pomoćnih supstanci i ambalaže u okviru finalnog farmaceutskog oblika, kao i pod uticajem spoljašnjih faktora kao što su povišena temperatura, svetlost, relativna vlaga, kiseonik, ugljen dioksid, mogu se javiti različite promene, pri čemu su pojedine specifične i karakteristične za određeni farmaceutski oblik [3]. Kod tečnih formi zbog visokog sadržaja vodene faze mikrobiološke promene uz porast prisustva i gljivica i plesni, predstavljaju najčešće zastupljenu interakciju, što je posebno karakteristično za biljne preparate [3].

Pojava degradacionih proizvoda zavisi pre svega od hemijskog sastava same aktivne supstance, odnosno biljne droge [3, 4, 11]. Npr glukofrangulini kao jedna grupa jedinjenja predstavljaju vrlo stabilna jedinjenja dok se oksidacije i degradacije javljaju vrlo brzo kod etarskih ulja, flavonoida, polifenola, antocijana, proantocijanidina [8, 13, 14]. Obzirom na različitu osetljivost aktivnih principa, kao i tip farmaceutskog oblika u koji se inkorporiraju mogu se očekivati različiti tipovi i intenziteti interakcija i promena [12].

U cilju utvrđivanja koliko je jedan proizvod stabilan, odnosno u cilju definisanja uslova čuvanja kao i postavljanja roka trajanja proizvoda ili perioda retestiranja, sprovode se ispitivanja stabilnosti, koja podrazumevaju ispitivanja uticaja faktora okoline: temperature, relativne vlažnosti vazduha, svetlosti na promenu kvaliteta gotovog proizvoda [4]. Sve upotrebene sirovine, ekscipijensi, i aktivne supstance, ekstraktivni proizvodi podležu ispitivanju stabilnosti i definisanju roka trajanja, u odgovarajućoj ambalaži i pod određenim ambijentalnim uslovima. Ispitivanja stabilnosti se izvode u različitim fazama razvoja i proizvodnje. U periodu istraživanja sprovodi se najpre stres testiranje sa ciljem odabira najoptimalnijih, kompatibilnih pomoćnih materija, odnosno najpovoljnije formulacije [2-4].

Za potrebe registracije, novog biljnog proizvoda ili ukoliko se vrše odgovarajuće izmene kod proizvoda redovnog asortimana sprovode se redovna, intermedijerna, i ubrzana studija stabilnosti u cilju definisanja roka trajanja i uslova čuvanja proizvoda [4].

Uslovi za sprovođenje studije biljnih preparata:

| | | |
|----------------|--|-----------|
| Redovna | $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60 % RH ± 5 | 12 meseci |
| Intermedijerna | $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 65 % RH ± 5 | 6 meseci |
| Ubrzana | $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75 % RH ± 5 | 6 meseci |

Značajnim promenama kod proizvoda u toku sprovođenja testa stabilnosti se smatra ukoliko dođe [4]:

- Pada sadržaja aktivnog principa za više od 5% u odnosu na inicijalnu vrednost
- Porasta vrednosti degradacionih proizvoda van granica postavljenih specifikacijom
- Fizičkih ili organoleptičkih promena na proizvodu
- Promena pH vrednosti van granica postavljenih specifikacijom
- Pada disolucije izvan zadatih granica (ispitivano na 12 uzoraka)

Ako biljni lek sadrži više aktivnih principa i ako nije moguće utvrditi stabilnost svake pojedinačne aktivne supstance, vrši se ispitivanje finalnog proizvoda odgovarajućim testovima, ali razlozi za neispitivanje pojedinačnih supstanci moraju biti navedeni u potpunosti. Sem toga, mora biti pokazano da interakcija između aktivnih supstanci i ekscipijensa u gotovom biljnom proizvodu neće biti [3, 4, 12, 15].

PRAĆENJE STABILNOSTI EKSTRAKTA

Ekstrakti su jedan od najviše korišćenih biljnih preparata [8, 16]. Ekstraktivni preparat se dobija podvrgavanjem biljnih droga metodama kao što su ekstrakcija, destilacija, ceđenje, frakcionisanje, prečišćavanje, koncentrovanje.

Ekstrakti koji se koriste za izradu biljnih lekova moraju biti standardizovanog kvaliteta [18]. Standardizacija ekstrakta podrazumeva

podešavanje sadržaja aktivnih komponenti na isti nivo, da bi se obezbedila uvek ista farmakološka aktivnost leka. Standardizacija ekstrakata se vrši indiferentnim pomoćnim materijama ili drugom serijom istog ekstrakata različitog sadržaja aktivne materije [8, 16-18].

Ekstrakti mogu biti kvantifikovani, u slučaju kada im je određen i izražen sadržaj aktivne komponente i obično se daje raspon u kojem treba da bude sadržaj aktivnih materija [18].

ISPITIVANJA PREMA OPŠTIM MONOGRAFIJAMA ZA EKSTRAKTE

Ekstrakti su biljni preparati tečne, polučvrste ili čvrste konzistencije [8, 16-18].

Svi tečni ekstrakti se ispituju prema opštoj monografiji za tečne ekstrakte i to obuhvata sledeća ispitivanja: relativne gustine, sadržaj etanola, metanola i 2-propanola, suvi ostatak [8]. Kod mekih (polučvrstih) i suvih ekstrakata se ispituje suvi ostatak. Mikrobiološka čistoća se ispituje kod svih ekstraktivnih preparata i to po kategorijama i prema načinu upotrebe. Određivanje sadržaja vlage je veoma važan parametar za suve ekstrakte, koji su inače higroskopni. Povišen sadržaj vode može prouzrokovati mikrobiološku kontaminaciju ekstrakta, kao i hidrolizu [8].

ISPITIVANJE HEMIJSKOG PROFILA EKSTRAKATA

U biljnim ekstraktima najčešće je prisutan veliki broj aktivnih supstanci poznatih i nepoznatih struktura koje imaju isto ili slično dejstvo i najčešće deluju sinergistički. Zato, ekstrakti imaju izraženije farmakološko dejstvo od izolovanih komponenti. Pristup u hemijskoj karakterizaciji ekstrakta se sastoji iz sledećih koraka:

- Hromatografska analiza svih sastojaka
- Analiza sastojaka koji su kvantitativno najzastupljeniji

Metode koje se primenjuju za hemijsku karakterizaciju supstanci biljnog porekla kao i ekstrakata su: tankoslojna hromatografija (TLC), tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), gasna hromatografija (GC), masena spektrometrija (MS), infracrvena spektrometrija (IRS), UV/VIS spektrometrija i kombinacija svih ovih metoda [1, 8-10, 16].

Za proveru stabilnosti u ekstraktivnim preparatima nije dovoljna provera stabilnosti aktivnih komponenti, već i drugih prisutnih komponenti, koji se mogu detektovani raznim hromatografskim metodama [4, 8]. Takođe je potrebno dokazati da njihov odnos tokom čuvanja ostaje konstantan. U ekstraktima koji sadrže više biljnih supstanci ili biljnih preparata, u kojima ne može da se ispita stabilnost svake aktivne komponente, stabilnost se određuje odgovarajućim hromatografskim testovima i drugim odgovarajućim fizičkim i senzornim testovima [1, 4, 8].

U skladu sa zahtevima EMEA (Evropska agencija za lekove i medicinska sredstva) za različite biljne preparate postavljaju se različiti specifični testovi [9, 10]. Pravilno koncipiranje specifikacije za preparate na bazi lekovitog bilja, upravo zbog njihove kompleksnosti u pogledu hemijskog sastava, Evropska regulativa smatra posebno važnim te daje posebne smernice i pisano uputstvo za pripremu biljne droge, ekstraktivnog preparata i fitopreparata i ispitivanje njihove stabilnosti. Ispitivanje stabilnosti biljnih proizvoda, s obzirom na njihovu prirodu i složen sastav, zahteva posebne uslove. Iako su studije ispitivanja stabilnosti biljnih lekova generalno uporedive sa komercijalno dostupnim lekovima koji sadrže hemijski definisane supstance, ispitivanje stabilnosti biljnih proizvoda ima posebne karakteristike [4]:

- ispituju se tri šarže biljnog proizvoda u odnosu na dve šarže lekova sa aktivnim principima
- biljni lekovi se testiraju samo na 25 °C / 60 RH, bez zahteva za intermedijerno i ubrzano ispitivanje stabilnosti
- za kvantifikovanje aktivnih principa u biljnom proizvodu koristi se test marker
- kod biljnih proizvoda moguće je \pm 5% ili 10% odstupanja od inicijalnih vrednosti.

Podaci za samo jednu pilot seriju za podnošenje zahteva za registraciju i samo jedna proizvodna šarža za post-odobrenje studija, umesto dve šarže bi trebalo da bude dovoljno za biljne preparate sa poznatim aktivnim supstancama. Za aktivne supstance u biljnim preparatima bi trebalo da bude moguće pozivati se na podatke dobijene za stabilnost uporedivih aktivnih supstanci, iz istog biljnog leka, i da je aktivna supstanca pokrivena podacima monografije od strane Evropske farmakopeje [4]. Donošenje novih zakona bi trebalo da dovede do povećanja zahteva u kontroli kvaliteta biljnih lekova, a kao posledica bi se mogli povećati troškovi proizvodnje a i zahtevi za registraciju, ali sve u cilju dobijanja kvalitetnog biljnog proizvoda sa potvrđene stabilnosti.

LITERATURA

1. WHO, Quality assurance of pharmaceuticals. A compendium of guidelines and related materials, vol 1, World Health Organization, 2007.
2. Handbook of Preformulation Chemical, Biological and Botanical Drugs, Sarfaraz K. Niazi. Pharmaceutical Scientist Inc. Deerfield, Illinois, U.S.A. 2007. by Informa Healthcare USA, Inc.
3. Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Herbal Medicinal Products (CPMP/QWP/2819/00, rev 1)
4. Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development: Regulations, Methodologies, and Best Practices, Kim Huynh-Ba Pharmalytik Newark, Delaware, 2009.

5. FDA Inactive Ingredients Database for Approved Drug Products, <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>.
6. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th Edition, Raymond C Rowe, Paul J Sheskey, Marian E Quinn, London, Chicago, Pharmaceutical Press, 2009.
7. Smernice Dobre proizvođačke prakse, "Službeni glasnik RS", br.28/2008
8. European Pharmacopoeia 7th edition, Council of Europe, Strasbourg, 2010
9. Guideline on Quality of Combination Herbal Medicinal Products / Traditional Herbal Medicinal Products (Doc. Ref. EMEA/HMPC/CVMP/214869/2006)
10. Guideline on Quality of Combination Herbal Medicinal Products / Traditional Herbal Medicinal Products (Doc. Ref. EMEA/HMPC/CVMP/214869/2006)
11. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances (CPMP/ICH/367/96)
12. Guideline on Stability Testing: Stability of Existing Active Substances and Related Finished Products (CPMP/QWP/122/02, rev 1 corr)
13. A. C. Ovando, L. P. Hernandez, E. P. Hernandez, J. A. Rodriguez, C. A. Galan-Vidal (2009): Chemical studies od anthocyanins: A review. Food Chemistry, **113**: 859-871
14. Ø. M. Andersen, K. R. Markham (2006): Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC Press, Taylor & Francais Group.
15. Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima „Sl. glasnik RS“, br. 99/2011.
16. Jugoslovenska farmakopeja 2000, peto izdanje, Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja, Savremena administracija, Beograd, 2000.
17. Vuleta G., Primorac M., Milić J., Savić S., Farmaceutska tehnologija I, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, 2012.
18. Tehničko-tehnološka dokumentacija Institut „Dr Josif Pančić“, Beograd.

STABILITY TESTING OF HERBAL MEDICINES

Nada Ćujić¹, Svetlana Ibrić², Dubravka Bigović¹, Nebojša Noveski¹,
Katarina Šavikin¹

¹Institute for Medicinal Plant Research „Dr Josif Pančić“, Tadeuša Koćuška 1, 11000
Belgrade, Republic of Serbia

²Faculty of Pharmacy, Department for pharmaceutical technology, University of Belgrade,
Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade, Republic of Serbia

SUMMARY

Nowdays, the use of products based on medicinal herbs (phytopreparates) are in scientific focus, both in prevention or in treatment of various diseases. Herbal products have been recognized as an excellent source of bioactive compounds which have positive effects on human health. Beside teas, as standard herbal products, phytopreparations are much more represented as final pharmaceutical form on the market today. Phytopreparations must satisfy standard quality, which means that they must be physically, chemically and microbiological stable and have a high degree of purity. In order to determine the stability, storage conditions, shelf- life of the products, stability tests are conducted, which involving tests of environmental factors influence: temperature, relative humidity, light. Stability tests are performed at different stages of development and production. In accordance with the EMEA (European Agency for Drugs and Medical Devices) for a variety of herbal preparations different specific stability tests are conducted.

Keywords: stability, herbal medicine, phytopreparation, plant extract