

CZU: 547.567.2:582+543.544.5

ELABORAREA METODEI DE DOZARE A TIMOCHINONEI ÎN PLASMĂ SANGUINĂ

Pavel BULGAC¹, Vladimir VALICA^{1,2}*

¹Catedra de chimie farmaceutică și toxicologică, ²Centrul de dezvoltare a medicamentului, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

Autor corespondent*: vladimir.valica@usmf.md

Introducere. Timochinona (TQ) este un compus chimic, din grupa benzochinonelor, depistat în unele specii de plante, cum ar fi *Nigella sativa* și *Monarda fistulosa*, care posedă un șir de proprietăți farmacologice: antioxidant, antiinflamator, antimicrobian, anticancerigen, antiglicemic, neuro și hepatoprotector [1,2]. Pentru dozarea TQ în material biologic, în literatură se propune metoda HPLC, însă unii autorii atenționează asupra problemei regăsirii analitului din plasmă.

Scopul lucrării. Elaborarea și validarea metodei HPLC de dozare a TQ în plasma sanguină, pentru aplicare în studii de biodisponibilitate și farmacocinetice.

Material și metode. Substanța TQ, luată în studiu, a fost izolată din părțile aeriene de monardă de către cercetătorii Centrului Științific al Medicamentului în cadrul proiectului Program de Stat (2020-2023): 20.80009.8007.14. Probele model cu derivatul TQ au fost preparate pe plasma sanguină de la donatori. Probele s-au analizat la cromatograful de lichide de înaltă performanță „Agilent 1260” cu detector UV-VIS cu șir de diode (DAD) și injector automat. Reactivii și solvenții utilizați au fost procurați de la Sigma-Aldrich.

Rezultate. Capacitatea maximă a plasmei sanguine de a lega TQ este circa 70-80 mg/l, iar concentrațiile mai joase se leagă practic complet și ireversibil, ceea ce face imposibilă determinarea TQ nemodificate la doze subletale. Se propune obținerea derivatului stabil al TQ imediat la prelevarea probei de material biologic. Reieșind din proprietățile chimice ale TQ, s-a selectat reacția cu 2-mercaptoetanol (ME), care parcurge același mecanism, ca și reacțiile TQ cu compuși tiolici naturali, dar cu o viteză mărită. S-a studiat cinetica reacției de derivatizare a TQ, fiind selectate și optimizate procedurile de preparare a probelor de plasmă pentru analiza HPLC. S-au propus 2 tehnici de preparare a probelor: deproteinizarea cu solvenți organici: amestec acetonitril–metanol (9:1) și extracția lichidă în varianta omogenă. Metoda elaborată de dozare a TQ în plasmă a fost validată după următorii parametri: linearitatea, domeniul de concentrații, limita de cuantificare, acuratețea, precizia, regăsirea analitului în probe, stabilitatea derivatului în probe preparate și material biologic.

Concluzii În urma validării metodei HPLC de dozare a derivatului TQ în plasma sanguină s-au evaluat valorile de regăsire a analitului din plasmă și stabilitatea lui pe termen scurt în probele preparate. Rezultatele validării demonstrează că metoda analitică propusă poate fi utilizată pentru dozarea TQ în plasma sanguină în diapazonul concentrațiilor 0,78-160 mg/l, prin deproteinizare cu solvenți organici și prin extracția omogenă, suficientă pentru efectuarea studiilor preclinice pe animale de laborator.

Cuvinte cheie: HPLC, timochinonă, plasmă, farmacocinetică.

Bibliografie.

- [1] C.C. Woo, A.P. Kumar, G. Sethi Tan, K.H.B. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem. Pharmacol.* 2012, 83, 443–451.
- [2] Salmani J. M. M., Asghar S., Lv H. and Zhou J., „Aqueous solubility and degradation kinetics of the phytochemical anticancer thymoquinone; probing the effects of solvents, pH and light,” *Molecules*, vol. 19, no. 5, pp. 5925–5939, 2014, doi: 10.3390/molecules19055925.

CZU: 547.567.2:582+543.544.5

DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR DETERMINATION OF THYMOQUINONE IN BLOOD PLASMA

Pavel BULGAC¹, Vladimir VALICA^{1,2 *}

¹Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, ²Drug Development Center, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy of the Republic of Moldova

Corresponding author*: vladimir.valica@usmf.md

Introduction. Thymoquinone (TQ) is a chemical compound, belonging to the benzoquinone group, detected in some plant species, such as *Nigella sativa* and *Monarda fistulosa*, which possesses a number of pharmacological properties: antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, anticarcinogenic, antiglycemic, neuro- and hepatoprotective [1,2]. For the determination of TQ in biological material, the HPLC method is proposed in the literature, but some authors warn about the problem of finding the analyte in plasma.

Aim of the study. Development and validation of the HPLC method for determination of TQ in blood plasma, applicable in bioavailability and pharmacokinetic studies.

Material and methods. The TQ substance, taken in the study, was isolated from the aerial parts of monarda by the researchers of the Scientific Drug Center within the project State Program (2020-2023): 20.80009.8007.14. TQ derivative model samples were prepared on blood plasma from donors. The samples were analyzed on the high-performance liquid chromatograph „Agilent 1260” with UV-VIS diode-array UV-VIS detector (DAD) and automatic injector. The reagents and solvents used were purchased from Sigma-Aldrich.

Results. The maximum blood plasma binding capacity for TQ is approximately 70-80 mg/l, at lower concentrations binding nearly completely and irreversibly, preventing the detection of unchanged TQ at sub-lethal doses. To address this, a stable TQ derivative is created directly upon sampling, using a reaction with 2-mercaptoethanol (ME) for faster kinetics, similar to TQ's natural thiol reactions. The derivatization kinetics were studied, and HPLC plasma sample preparation methods were optimized, including two techniques: acetonitrile-methanol (9:1) deproteinization and liquid extraction. The validated TQ detection method in plasma met standards for linearity, quantification limits, accuracy, precision, analyte recovery, and derivative stability.

Conclusion. Following the validation of the HPLC method for dosing the TQ derivative in blood plasma, the recovery values of the analyte in the plasma and its short-term stability in the prepared samples were evaluated. The results of the validation demonstrate that the proposed analytical method can be used for TQ dosing in blood plasma in the concentration range 0.78-160 mg/l, by deproteinization with organic solvents and by homogeneous extraction, sufficient to perform preclinical studies on laboratory animals.

Key words: HPLC, thymoquinone (TQ), plasma, pharmacokinetics.

Bibliography.

- [1] C.C. Woo, A.P. Kumar, G. Sethi Tan, K.H.B. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem. Pharmacol.* 2012, 83, 443–451.
- [2] Salmani J. M. M., Asghar S., Lv H. and Zhou J., „Aqueous solubility and degradation kinetics of the phytochemical anticancer thymoquinone; probing the effects of solvents, pH and light,” *Molecules*, vol. 19, no. 5, pp. 5925–5939, 2014, doi: 10.3390/molecules19055925.

Author's ORCID

Vladimir Valica

<https://orcid.org/0000-0002-1068-5504>