

CONTRIBUȚII LA STANDARDIZAREA FRUNZELOR CU FLORI DE CRATAEGUS MONOXYNA JACQ. ȘI CRATAEGUS CURVISEPALA LINDM. ȘI A PRODUSELOR EXTRACTIVE

Ana Casian¹, Igor Casian¹, Ion Ungureanu²

Centrul Științific în domeniul Medicamentului¹, Centrul de Cultivare a Plantelor Medicinale²

Summary

Contributions to standardization of the Crataegus monogyna Jacq. and Crataegus curvisepala Lindm. leaf and flowers, and extractive products

A simple and rapid HPLC-UV method has been developed to quantify pharmacologically active compounds in leaf and flowers of Hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq. and *Crataegus curvisepala* Lindm.) and in extractive products.

The whole standardization procedure also includes the quantification of total procyanidins by Folin-Ciocalteu method.

The proposed HPLC method allowed to simplify considerably the procedure of sample preparation.

Rezumat

S-a elaborat o metodă HPLC-UV simplă și rapidă pentru dozarea compușilor farmacologic activi în frunze și flori de păducel (*Crataegus monogyna* Jacq. și *Crataegus curvisepala* Lindm.) și în produsele extractive.

Procedura de standardizare în ansamblu include de asemenea dozarea procianidinelor totale prin metoda Folin-Ciocalteu.

Metoda HPLC propusă a permis de a simplifica considerabil procedura de preparare a probelor.

Actualitatea temei

În ultimul deceniu nomenclatura fitopreparatelor a crescut considerabil, inclusiv și a celor aplicate în terapia cardiacă.

Păducelul (genul *Crataegus*, familia *Rosaceae*) este utilizat în practica medicală în special în calitate de remediu antiaritmie, cardi tonic, antihipertensiv, sedativ ș. a. Se utilizează florile și frunzele, recoltate în perioada butonizării și înfloririi, totodată și fructele la etapa maturării lor depline. Există o gamă largă de produse farmaceutice din păducel, sub formă de extract uscat și tincturi.

Compoziția chimică a păducelului este complexă și include compuși din diverse grupe, cum ar fi procianidine oligomerice, acizi oxicinamici, flavanoizi – derivați ai apigeninei, cvercetinei ș. a. Plantele medicinale a aceleași specii pot să difere după conținutul unor compuși activi datorită multor factori (variația genetică a speciei, condițiile de creștere, timpul colectării, condițiile de uscare și păstrare), fapt ce modifică efectul terapeutic.

Din aceste considerente speciile *C. monogyna* Jacq. și *C. curvisepala* Lindm., întâlnite mai des prin pădurile și unele parcuri ale Moldovei, necesită un studiu mai profund din punct de vedere al factorilor sus nominalizați. Una din cerințele contemporane către plantele medicinale este standardizarea lor după substanțele active, care trebuie să aibă o nouă strategie a studiului și anume:

- elaborarea și aplicarea metodelor moderne, de înaltă performanță pentru standardizarea fitopreparatelor înainte de a efectua studii farmacologice și clinice sistematice;

- estimarea efectului farmacologic al compușilor individuali activi și în componența extractelor din plante pentru a elucida mecanismul de acțiune, inclusiv și efectele sinergice posibile dintre ei;
- studii clinice placebo-controlate cu efectuarea paralelă sau ulterioară a investigațiilor de farmacocinetică și biodisponibilitate [1].

Obiectivele lucrării

Scopul prezentei lucrării constă în elaborarea unor proceduri simple și eficiente de dozarea a mai multor compuși activi în speciile *C. monogyna* Jacq. și *C. curvisepala* Lindm., care pot fi utilizate pentru standardizarea materiei prime și a produselor extractive.

Materiale și metode

În lucru s-a utilizat cromatograful de lichide din seria Jasco LC-2000, dotat cu două pompe, amestecător dinamic sau static (opțional) de presiune înaltă, injector manual, termostat de coloane și detector UV-VIS cu șir de diode (DAD). Componentii soluției tampon au fost cu grad de puritate “chimic pur”, iar acetonitrilul – “pentru HPLC”. Substanțele de referință au fost procurate de la “Fluka” și “Sigma-Aldrich”.

Rezultate și discuții

Metodele de dozare a compușilor activi în frunzele cu flori de păducel, incluse în USP-29 [2], presupun hidroliza diferitor glicozide flavonice și flavonolice până la vitexin și quercetină corespunzător înainte separării lor cromatografice. Această abordare permite analiza diferitor specii din genul *Crataegus* prin metode unificate, iar prepararea probelor pentru cele două grupe de flavonoizi este îndelungată și separată. De pe altă parte, prepararea probelor cu mai multe etape, inclusiv transformarea chimică, poate deveni o sursă de majorare a erorii la analiza cantitativă. Luând în considerație faptul că în Republica Moldova sunt două specii mai răspândite (*C. monogyna* Jacq. și *C. curvisepala* Lindm.), care prezintă interes pentru industria farmaceutică, am avut ca obiectiv studiul lor, realizarea căruia necesită elaborarea unei metode simple pentru analiza speciilor sus numite, care va permite dozarea diferitor grupe de flavonoizi într-o singură probă fără hidroliza lor preliminară.

Separarea cromatografică s-a realizat pe coloana analitică cu faza inversă (C-18) în gradient de concentrație a acetonitrilului în tampon fosfat. În faze mobile acide flavonoizii formează picuri cromatografice cu forma mai bună, dar în cazul dat se observă interferență din partea unor acizi fenolcarbonici, înlăturarea căreia s-a realizat utilizând tamponul cu pH-ul circa 6,2. În calitatea de lungime de undă analitică s-a stabilit lungimea 340 nm, corespunzătoare cu maximul de absorbantă a glicozidelor flavonice. De menționat, că și alte grupe de compuși fenolici posedă la aceasta lungimea de undă absorbantă suficientă pentru analiza cantitativă.

Condițiile cromatografice au fost optimizate pentru atingerea rezoluției suficiente la durata minimă a analizei, luând în considerație faptul că profilul gradientului real diferă de cel programat și depinde de parametrii sistemului cromatografic, în special ai amestecătorului de solvenți. În rezultat am obținut două variante ale metodei, orientate la utilizarea amestecătorului dinamic Jasco MX-2080-32 (volumul camerei de amestecare 1,5 ml) și amestecătorului static Jasco HG-980-30. Forma gradientelor reale la ieșirea din coloană a fost calculată, aplicând modelul matematic, alcătuit din camera ideală de amestecare și camera ideală de substituire, conectate consecutiv. Valorile volumului camerei de substituire, precum și volumul efectiv al camerei de amestecare (pentru amestecătorul static) s-au evaluat din cromatogramele ce prezintă răspunsul sistemului la schimbarea prin salt a concentrației acetonitrilului în faza mobilă.

Varianta 1 (pentru sistem cu amestecător dinamic).

Condiții cromatografice: Coloana Uptisphere 3 ODB cu dimensiunile interne 4.6 x 150 mm; faza A – acetonitril; faza B – tampon fosfat: 0,05 M KH_2PO_4 + 0,01 M K_2HPO_4 ; gradient linear de la 6% până 33% A în B timp de 15 min cu viteza volumetrică 1 ml/min; timpul înregistrării cromatogramei – 18 min; intervalul de injectare a probelor – 22 min.

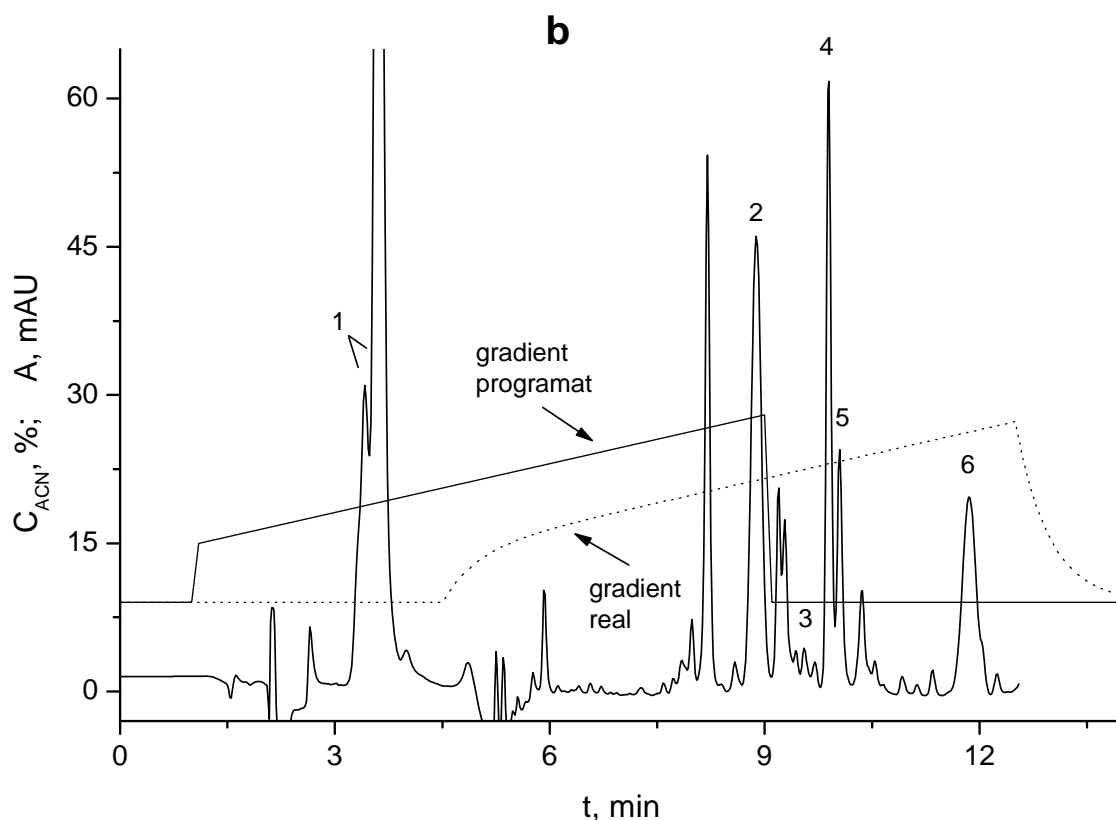
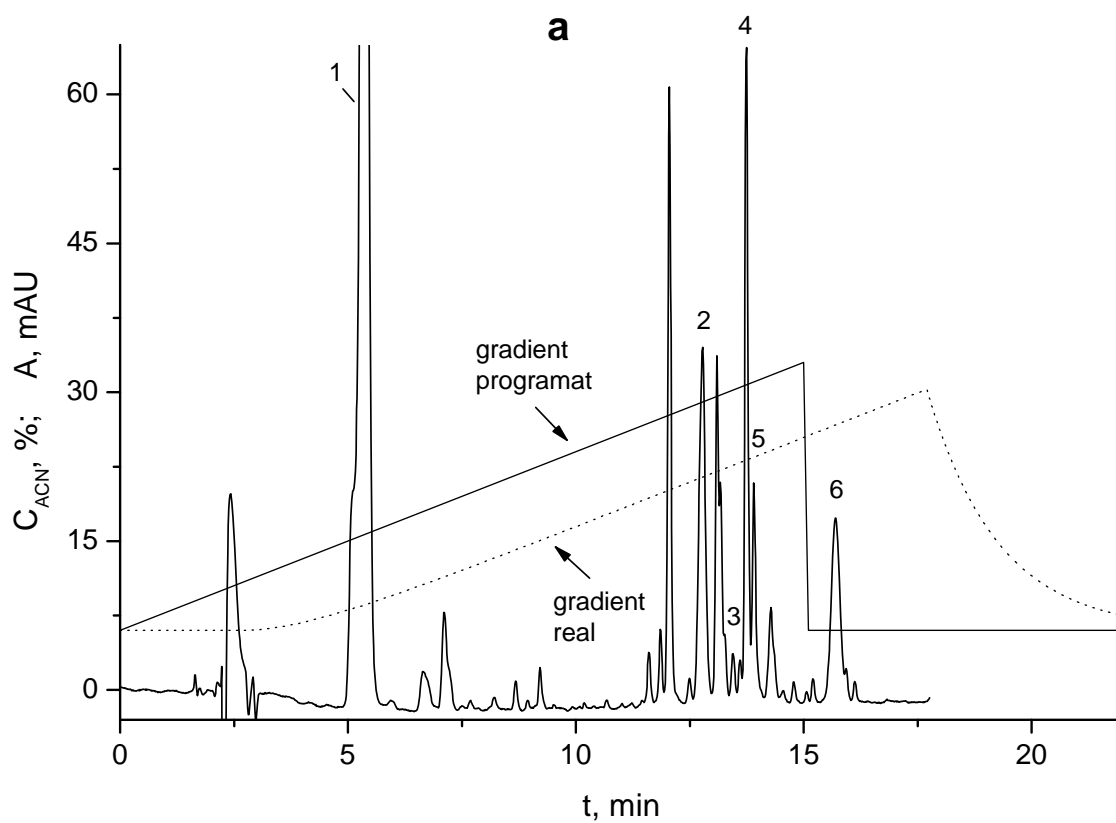


Fig. 1. Cromatogramele extractului din frunze cu flori de *C. monogyna* Jacq. și *C. curvisepala* Lindm. și forma gradientului programat și real (calculat) la ieșirea din coloană la utilizarea amestecătorului dinamic (a) și static (b). Componentii identificați: 1 – acizi oxicinamici; 2 – vitexin-2"-O-ramnozidă; 3 – rutozidă; 4 – hiperozidă; 5 – isocvercitrină; 6 – monoacetil-vitexin-2"-O-ramnozidă.

Cromatograma extractului din frunze și flori de păducel, obținută în aceste condiții, este prezentată pe fig. 1a. Compușii activi au fost identificați după corespunderea timpurilor de retenție (pentru substanțe individuale) și a spectrelor de absorbție în UV-VIS (pentru grupele chimice), folosind substanțele de referință: acid clorogenic, rutozidă, hiperozidă și vitexin-2"-O-ramnozidă.

Varianta 2 (pentru sistem cu amestecător static).

La utilizarea sistemului cu amestecător static, care a demonstrat un volum efectiv mult mai mic al camerei de amestecare (circa 0,5 ml), se observă, de asemenea, și reducerea timpului de restabilire a condițiilor inițiale în sistemul cromatografic după finisarea programului de gradient (cum se vede pe fig. 1b). Acest fapt a permis diminuarea intervalului de injectare a probelor. Reducerea ulterioară a timpului de analiză s-a dovedit a fi posibilă prin aplicarea gradientului cu mai multe segmente: 9% A în B / 0-1 min; 9-15% A în B / 1-1,1 min; 15-28% A în B / 1,1-9 min; timpul înregistrării cromatogramei – 12,6 min; intervalul de injectare a probelor – 14 min. Restul condițiilor cromatografice sunt aceleași ca și în varianta 1.

Pentru analiza cantitativă în ambele variante s-a aplicat metoda standardului extern, utilizând soluția de calibrare cu conținut de acid clorogenic, hiperozidă și vitexin-2"-O-ramnozidă, a câte 40 mg/l fiecare. Glicozidele flavonice – grupul principal al substanțelor active – se determină după suma ariilor picurilor de vitexin-2"-O-ramnozidă și monoacetil-vitexin-2"-O-ramnozidă în recalculare la vitexin-2"-O-ramnozidă; glicozidele flavonolice – după suma picurilor de hiperozidă, isocvercitrină și rutozidă (dacă se depistează pe cromatogramă) în recalculare la hiperozidă. Metoda permite de asemenea dozarea sumei acizilor oxicinamici (recalculate la acid clorogenic), rolul cărora în acțiunea farmacologică până în prezent nu este stabilit definitiv.

Pentru analiza produsului vegetal s-a utilizat o simplă tehnică de preparare a probelor: Circa 0,5 g (masa exactă) materie primă fragmentată, care trece prin sita cu diametru orificiilor 1 mm, se introduce în balon cu capacitatea 100 ml, se adaugă 50 ml alcool etilic 40%, se încălzește pe baia de apă la temperatura $60 \pm 2^\circ\text{C}$ timp de 30 min, amestecând periodic. Apoi conținutul balonului se filtrează prin tampon de vată într-un balon cotat cu capacitatea 100 ml. Tamponul cu materia primă se reîntorc în primul balon și extracția se repetă încă o dată în aceleași condiții. Extractul sumar se răcește până la temperatura 20°C și se completează până la volumul de 100 ml cu extragent pur. Alicota se centrifughează 5 min la 3000-4000 g. Câte 10 μl probă obținută și a soluției standard se injectează consecutiv în sistemul cromatografic. Regăsirea analiților la aplicarea acestei tehnicii de extracție constituie circa 99% pentru glicozide flavonice și flavonolice și circa 96% pentru acizi oxicinamici.

La analiza produselor extractive din frunze cu flori de păducel se aplică diluarea de 20-100 ori (pentru tincturi și extracte lichide) sau dizolvarea în alcool etilic 20-40% (pentru extractele uscate și formele farmaceutice solide), urmată de centrifugare sau filtrarea prin membrană.

Dozarea prin metoda HPLC a procianidinelor – uneia din grupele de substanțe active – este problematică, deoarece pe cromatograme se depistează doar catehina, epicatehina și unii oligomeri inferiori (detectați la 280 nm), care prezintă doar o parte minoră din conținutul total al procianidinelor. Soluționarea acestei probleme este posibilă prin dozarea procianidinelor, exprimate ca suma compușilor fenolici, aplicând metoda Folin-Ciocalteu [3], având în vedere faptul, că procianidinele constituie o parte majoră din cantitatea totală a componentilor fenolici în această plantă. Noi am folosit metoda modificată în varianta semi-micro. Esența modificării constă în majorarea valorii pH-ului amestecului reactant prin înlocuirea soluției carbonat de sodiu concentrat cu tampon carbonat-hidroxid. Ca rezultat timpul optim al reacției s-a micșorat până la 10-15 min.

Tehnică de lucru pentru dozarea sumei compușilor fenolici: 20 μl probă, preparată pentru analiza HPLC, se diluează cu 2 ml apă, se adaugă 30 μl reactiv Folin-Ciocalteu (descriș în Farmacopeea Europeană sub denumirea de reactiv fosfomolibdenowolframic [4, 5]), apoi se adaugă 400 μl soluție tampon cu conținut de 0,4 Mol/l Na_2CO_3 și 0,3 Mol/l NaOH. În intervalul 10-15 min după adăugarea ultimului reactiv se citește absorbanta la lungimea de undă 740 nm,

folosind în calitate de soluție de compensare amestecul de reactivi. Paralel se citește absorbanta probei de etalonare, preparate din 20 µl soluție alcoolică de (-) epicatehină 0,5 mg/ml. Circa 75% din valoarea găsită aparține sumei procianidinelor. Alte substanțe fenolice de asemenea reacționează cu reactivul Folin-Ciocalteu, dar cu sensibilitatea redusă. Răspunsul relativ față de (-) epicatehină a constat 0.89 pentru acidul clorogenic, 0.64 pentru hiperozidă și 0.41 pentru vitexin-2"-O-ramnozidă.

Recomandăm de-a include acest test în documentația analitică de normare a calității atât a materiei prime cât și produselor farmaceutice din păducel, fiind că procianidinele sunt substanțe ușor oxidabile și cantitatea lor se poate micșora esențial în condiții nefavorabile de uscare și păstrare a materiei prime, precum și în decursul unor procese tehnologice de fabricare a produselor extractive.

Analiza eşantioanelor de frunze cu flori de păducel, colectate în ultimii 3 ani din diferite localități în centrul republicii, a demonstrat că componența chimică (după grupe) a speciilor este destul de reproductibilă și se exprimă prin următoarele valori generalizate: Glicozide flavonice (recalculate la vitexin-2"-O-ramnozidă) – 8-10 mg/g; glicozide flavonolice (recalculate la hiperozidă) – 5-7 mg/g; acizi oxicinamici (recalculate la acid clorogenic) – 13-20 mg/g; suma substanțelor fenolice (recalculate la (-) epicatehină) – 80-100 mg/g. Componența chimică a celor două specii studiate este asemănătoare, cu excepția faptului că *C. monogyna* nu conține compusul monoacetil-vitexin-2"-O-ramnozidă, în timp ce suma glicozidelor flavonice în ambele specii este foarte apropiată.

Concluzii

S-a elaborat metoda HPLC-UV rapidă și eficientă pentru dozarea glicozidelor flavonice și flavonolice, precum și a acizilor oxicinamici în speciile *Crataegus monogyna* Jacq. și *Crataegus curvisepala* Lindm., care poate fi aplicată la standardizarea materiei prime și produselor extractive.

Se recomandă includerea în procedura de standardizare și dozare a sumei procianidinelor prin metoda Folin-Ciocalteu, fiind substanțele cele mai labile în condiții nefavorabile de păstrare și prelucrare a materiei prime.

Bibliografie

1. Wagner H. Natural products chemistry and phytomedicine research in the new millennium: new developments and challenges. ARKIVOC 2004 (vii) p. 277-284.
2. Hawthorn leaf with flower. USP 29–NF 24, p. 2348.
3. European Pharmacopoeia, 6th edition, 2009 (6.5), art. 2.8.14. Determination of tannins in herbal drugs.
4. European Pharmacopoeia, 6th edition, 2009 (6.5), art. 4.01.01. Reagents.
5. Farmacopeea Română, ediția X, p. 1218.

CENTAUREA CYANUS L. – SURSĂ DE POLIZAHARIDE

Tatiana Chiru, Anatolie Nisteanu, Rodica Gaiduc

Catedra Farmacognozie și Botanică farmaceutică USMF „Nicolae Testemițanu”

Summary

Centaurea cyanus L. – source of polysaccharides

Nowadays the interest in polysaccharides, particularly of vegetable nature, as substances with low toxicity, is growing. Natural products with polysaccharides have pectoris, antiulcer, immunostimulating, antimicrobial, anti-inflammatory, laxative, diaphoretic properties. Therefore, the study of medicinal plants containing polysaccharides is actual today and will be useful for the future elaboration of new pharmaceutical drugs.